

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**MODIFICACIONES EN EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE
PROTEÍNAS ASOCIADAS CON EL METABOLISMO
ENERGÉTICO EN VENTRÍCULO IZQUIERDO DE RATAS
OBESAS E HIPERTENSAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Javier Modrego Martín

Bajo la dirección de los doctores

Antonio José López Farré

Vicente Lahera

Carlos Macayaero

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**MODIFICACIONES EN EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
ASOCIADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN VENTRÍCULO
IZQUIERDO DE RATAS OBESAS E HIPERTENSAS**

TESIS DOCTORAL

JAVIER MODREGO MARTIN

Hospital Clínico San Carlos. Madrid.

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ

Dr. VICENTE LAHERA

Dr. CARLOS MACAYA

Dr. Antonio José López Farré, Jefe de la Unidad de Investigación Cardiovascular,

Dr. Vicente Lahera y Dr. Carlos Macaya.

CERTIFICAN:

Que Don Javier Modrego Martín ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado

**“MODIFICACIONES EN EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
ASOCIADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN VENTRÍCULO
IZQUIERDO DE RATAS OBESAS E HIPERTENSAS”**

con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste, expedimos el presente certificado en Madrid a de 2012.

Dr. Antonio José López Farré

Dr. Vicente Lahera

Dr. Carlos Macaya

Esta tesis doctoral ha sido dirigida
por los Dres. Antonio José López Farré, Vicente Lahera y Carlos Macaya
y financiada por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III
(Red Heracles RD06/0009)

A mis padres, a quienes debo todo

A Patri, la luz de mi camino

AGRADECIMIENTOS

Quienes me conozcan bien, sabrán que no me resulta fácil expresar a veces ciertos sentimientos o emociones pero creo que esta vez la ocasión merece la pena. El trabajo realizado en esta tesis ha sido un camino largo y duro pero a la vez motivador y gratificante, por ello me gustaría agradecer a varias personas que han contribuido de una manera u otra a que esta tesis salga adelante.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis, al Dr. Carlos Macaya por todas las facilidades que nos ha dado para poder trabajar en el Instituto Cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos. Al Dr. Vicente Lahera por su disponibilidad en todo momento para cualquier cuestión o duda y por su implicación en todo momento en esta tesis. Y muy especialmente al Dr. Antonio J. López Farré, por darme la oportunidad de entrar a formar parte de su equipo investigador y por la confianza que me ha dado desde el primer día que forme parte de dicho equipo. Muchas gracias por todo Antonio.

No puedo dejar de agradecer al Dr. Santos Casado, por inculcarnos y enseñarnos lo que realmente es amar la medicina y la biología y hacerlo totalmente desinteresadamente y vocacionalmente.

A la Dra. Victoria Cachofeiro, Dra. Natalia de las Heras, Dra. Beatriz Martín y Sandra Ballesteros por su trabajo con los modelos animales experimentales y sin las que indudablemente nunca habría salido esta tesis adelante.

A mis compañeros de la Unidad de Investigación Cardiovascular, sin los que evidentemente no hubiera sido posible la realización de esta tesis doctoral. A los

actuales, Pablo, Laura y Paula, por soportarme y hacerme el día a día más fácil. A la Dra. Petra Jiménez, por darme su ayuda y experiencia siempre que la he necesitado. A Begoña, por sus consejos y por siempre estar ahí para ayudarme ante cualquier dificultad. Y muy especialmente, al Dr. José J. Zamorano por demostrarme que ser compañeros de trabajo y amistad no son excluyentes. ¡Jose está tesis también es tuya! Y a otros que han pasado por el laboratorio pero que siempre recordaré, en especial a Rosario.

Al baloncesto, el cual me inculcó valores y la ambición de mejorar constantemente.

A Byron, por demostrarme que no solo el ser humano es capaz de dar cariño.

A la familia Alonso Ruiz, por haberme acogido desde el primer momento como uno más.

A mis abuelos, los que están, José y Luisa, sé que estarán orgullosos del primer nieto que tuvieron, a los que ya no están, Juan y Dolores, sé a ciencia cierta que les haría mucha ilusión ver a su nieto doctorarse.

A mi madre, por ser una luchadora del día a día, por su sacrificio constante, por estar encima de mí constantemente para que siguiera el camino adecuado y no desviarme. Espero no haberte decepcionado mamá.....

A mi padre, un trabajador nato, por todas las charlas que hemos tenido desde una temprana edad, por enseñarme tanto de la vida, por guiarme a lo largo de los años... Espero sigas con tu lucha.....

A ambos como conjunto, ha pasado mucho tiempo desde que me preguntabais la lección, y me decíais lo importante que era estudiar en la vida, es ahora cuando veo la importancia de esas palabras. Gracias por guiarme por el buen camino, en un barrio donde era demasiado fácil perderse..... Os quiero aunque no lo diga muy a menudo.

Y por supuesto a Patri, mi amiga, mi compañera, mi razón de ser. Gracias por siempre estar ahí, por cuidar tanto de mí, por tu cariño, por ser como eres. Gracias por existir.

***"La gota horada la roca, no por su fuerza
sino por su constancia."
Ovidio (43 a.C.-17 d.C.)***

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1-4
INTRODUCCIÓN	5
<hr/>	
1. EL CORAZÓN COMO ÓRGANO CONTRÁCTIL	6
1.1. Estructura	6
1.1.1. Macroscópica.	6
1.1.2. Microscópica.....	7-10
1.2. Potencial de acción	10
1.3. Acoplamiento excitación/contracción.	11
1.4. Proteínas contráctiles	12-15
2. EL METABOLISMO ENERGÉTICO DEL CORAZÓN NORMAL.....	15
2.1. Captación de ácidos grasos por las células cardíacas.....	15
2.2. β -oxidación de los ácidos grasos.....	17
2.3. El Ciclo de Krebs en el metabolismo cardíaco.....	18-20
2.4. Variaciones de las fuentes energéticas del corazón.....	20
2.4.1. Glucolisis.....	20
2.4.2. Cuerpos cetónicos.....	22
2.4.3. Creatinina fosfoquinasa.....	22
2.4.4. Adenilato quinasa.....	22
3. ALTERACIONES DEL METABOLISMO ASOCIADAS A PATOLOGÍAS	
CARDIACAS.....	22
3.1. Metabolismo energético en corazón hipertrófico.....	23
3.1.1. Metabolismo glucídico en la hipertrofia miocárdica.....	23
3.1.2. Mecanismos potenciales del incremento de la dependencia de glucosa.....	24-26

3.2. Metabolismo energético cardiaco en obesidad.....	26
3.2.1. Acumulación lipídica cardiaca.....	27
3.2.2. Metabolismo de ácidos grasos en el corazón en condiciones de obesidad.....	27
3.2.2.1. Activación de los receptores activados por proliferadores de peroxisoma	27
3.2.2.2. Activación de carnitina palmitoil transferasa I (CPT-I).....	28
3.2.3. Metabolismo de la glucosa en obesidad.....	28
3.2.4. Alteración de la síntesis de adipoquinas en obesidad.....	29
3.2.4.1. Efectos cardiacos de la adiponectina.....	30
3.2.4.2 Efectos cardiacos de la leptina.....	30
3.3. Metabolismo energético cardiaco en la resistencia a insulina y la diabetes.....	31
3.3.1. Efectos de la resistencia a insulina y diabetes sobre la oxidación del piruvato	
.....	32
3.3.2. Efectos de la resistencia a insulina y diabetes sobre la oxidación de ácidos	
grasos.....	32
3.3.3. Efecto de la resistencia a la insulina y la diabetes en la fosforilación oxidativa	
mitocondrial.....	32
4. MIOCARDIOPATIA HIPERTENSIVA.....	33
4.1. Mecanismos de estimulación de la hipertrofia cardiaca.....	34
4.2. Mecanismos hemodinámicas de la hipertrofia del ventrículo izquierdo.....	34
4.2.1. Mecanotransducción.....	35
4.3. Mecanismos autocrino-paracrino del miocardio en respuesta a una sobrecarga	
hemodinámica.....	35
4.3.1. Factores de crecimiento.....	35
4.3.2. Angiotensina-II.....	36
4.3.3. Miotrofina.....	36
4.4. Mecanismos no hemodinámicas de la hipertrofia del ventrículo izquierdo.....	36

4.4.1. Neurotransmisores.....	37
4.4.2. Hormonas.....	37
5. SÍNDROME METABÓLICO.....	38
6. EFECTOS DEL SOBREPESO Y LA OBESIDAD SOBRE EL CORAZÓN.....	39
7. MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS.....	40
8. MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA RICA EN GRASA.....	41
9. PROTEÓMICA.....	42-44
9.1. Fundamentos de la técnica.....	45
9.2. Análisis de imagen.....	47
9.3. Espectrometría de masas.....	48-50
9.4. Antecedentes de la proteómica del corazón en situaciones normales y patológicas....	50
HIPÓTESIS.....	52-55
OBJETIVOS.....	56
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57

1. ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL CORAZÓN HIPERTRÓFICO DE RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS.....	58
2. ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL CORAZÓN DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA RICA EN GRASA.....	58
3. PARÁMETROS HEMODINÁMICOS, ARTERIALES Y DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO.....	59

4. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-DE).....	59
5. TINCIÓN CON PLATA.....	60
6. ADQUISICIÓN Y ANALISIS DE IMÁGENES.....	60
7. ESPECTROMETRIA DE MASAS.....	61
8. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	62
9. DETECCIÓN DE PIRUVATO Y LACTATO.....	63
10. PARÁMETROS METABÓLICOS.....	63
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	64
 RESULTADOS	 66
1. ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL MODELO DE CORAZÓN HIPERTROFICO DE RATAS HIPERTENSAS.....	67
<i>1.1.-Peso del corazón y parámetros hemodinámicos.....</i>	<i>67</i>
<i>1.2.-Análisis de proteínas en el ventrículo izquierdo cardiaco de ratas WKY y SHR.....</i>	<i>68-72</i>
1.2.1.-Proteínas asociadas a la β -oxidación.....	72
1.2.2.-Proteínas asociadas a la glucolisis.....	73
1.2.3.-Proteínas asociadas al Ciclo de Krebs.....	74-76
1.2.3.1.-Contenido de piruvato.....	76
1.2.4.- Proteínas asociadas a la fosforilación oxidativa mitocondrial.....	77
1.2.5.-Proteína creatina quinasa.....	78
2. ANÁLISIS DE RESULTADADOS DEL MODELO DE CORAZÓN DE RATAS CON SOBREPESO.....	79
2.1.-Proteínas asociadas con la β -oxidación y glucolisis.....	81-83
2.2.-Proteínas asociadas con el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa mitocondrial.....	83

2.3.-Asociación entre los cambios en la expresión de proteínas metabólicas en el ventrículo izquierdo, biomarcadores funcionales y parámetros circulatorios.....	84-86
--	-------

DISCUSIÓN	88
------------------	-----------

1. MODELO DE CORAZÓN HIPERTROFICO DE RATAS HIPERTENSAS.....	89
1.1. <i>Cardiopatía hipertrófica y hemodinámica.....</i>	89
1.2. <i>Proteínas asociadas a la β-oxidación de los ácidos grasos.....</i>	90-92
1.3. <i>Proteínas asociadas a la glucolisis.....</i>	93
1.4. <i>Oxidación de la glucosa.....</i>	94
1.5. <i>Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.....</i>	95
1.6. <i>Proteínas asociadas a la fosforilación oxidativa mitocondrial.....</i>	96
1.7. <i>Creatina quinasa.....</i>	97
1.8. <i>Limitaciones del estudio.....</i>	98
2. MODELO DE CORAZON DE RATAS CON SOBREPESO.....	99
2.1. <i>Cambios en la β-oxidación de los ácidos grasos.....</i>	100
2.2. <i>Glucolisis en el ventrículo de ratas alimentadas con dieta rica en grasa.....</i>	101
2.3. <i>Leptina y metabolismo energético en el ventrículo.....</i>	102-104

RESUMEN Y CONCLUSIONES	105-109
-------------------------------	----------------

BIBLIOGRAFÍA	110-135
---------------------	----------------

ANEXO	136
--------------	------------

ABREVIATURAS

Relación de las abreviaturas más empleadas en el texto. En algunos casos se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés por ser ésta la más utilizada.

ACC: acetil CoA carboxilasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosin difosfato

AMP: Adenosin monofosfato

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosin trifosfato

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propenosulfonato

CoA: Coenzima A

CPT-I: Carnitina palmitoil transferasa I

CPT-II: Carnitina palmitoil transferasa II

COX-2: Ciclooxygenasa-2

+dP/dt max: Primera derivada de la presión ventricular respecto al tiempo

-dP/dt min: Primera derivada negativa de la presión del ventrículo respecto al tiempo

DRG: Dieta rica en grasa

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

ELISA: Enzyme-linked immunoabsorbent assay

FAD: Flavina adenina dinucleótido

FADH₂: Flavina adenina dinucleótido reducido

FC: Frecuencia cardíaca

FFQ: Fosfofructo quinasa

GDP: Guanosin difosfato

GTP: Guanosín trifosfato

HOMA: Homeostasis model assessment

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HRP: Peroxidasa de rábano

HVI: Hipertrofia del ventrículo izquierdo

IMC: Índice de masa corporal

MALDI: Matrix assisted laser desorption/ionization

MS: Espectrometría de masas

MS/MS: Espectrometría de masas en tandem

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NO: Óxido nítrico

NOSe: Óxido nítrico sintasa endotelial

P: Fosfato inorgánico

PAD: Presión arterial diastólica

PAS: Presión arterial sistólica

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PDFVI: Presión diastólica final del ventrículo izquierdo

pI: Punto isoelectrico

Pm: Potencial de membrana

PPAR: Receptores alfa inductores de la proliferación de peroxisomas

PRS: Peso relativo del corazón (g/100 g peso corporal)

PSVI: Presión sistólica del ventrículo izquierdo

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SHR: Ratas espontáneamente hipertensas

SM: Síndrome metabólico

TBS: Tris-buffered saline

TFA: Ácido trifluoroacético

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

WKY: Ratas Wistar-Kyoto

INTRODUCCIÓN

1.- EL CORAZÓN COMO ÓRGANO CONTRÁCTIL

El aparato circulatorio se compone de una bomba o motor circulatorio (corazón) y unos conductos de transporte (vasos sanguíneos) que comienzan (arterias) y acaban (venas) en el corazón, y a través de los cuales circula un fluido, la sangre. La función principal del corazón es transportar sangre desde el territorio venoso de baja presión al sistema arterial de alta presión. En realidad, se trata de transportar sangre con poco O₂ a los pulmones, y sangre rica en O₂ y nutrientes hacia los distintos tejidos de acuerdo con las necesidades metabólicas del organismo.

1.1.- Estructura

1.1.1.- Macroscópica

El corazón es un órgano muscular hueco, en forma de cono invertido, con el vértice dirigido hacia abajo, hacia adelante y hacia la izquierda, y la base hacia arriba, que se extiende entre la segunda costilla y el quinto espacio intercostal. Consta de cuatro cavidades o cámaras (Figura 1), las dos superiores se denominan aurículas, y las dos inferiores ventrículos, que están separadas entre sí por el esqueleto fibroso, así como por los correspondientes septos o tabiques, interauricular e interventricular, que impiden que se mezcle la sangre de los dos lados, derecho e izquierdo del corazón.

Las aurículas son cavidades que presentan una pared delgada y presiones bajas. Su función es almacenar la sangre que procede del territorio venoso sistémico (aurícula derecha) y pulmonar (aurícula izquierda) durante la contracción (sístole) ventricular. La sangre llega a la aurícula derecha a través de tres venas: la cava superior (drena la sangre de la porción supradiafragmática), la cava inferior (drena la sangre infradiafragmática) y el seno coronario (drena la sangre del propio corazón); la aurícula izquierda recibe la sangre procedente de los pulmones a través de las venas pulmonares. La sangre almacenada en las aurículas pasa de forma pasiva hacia los ventrículos durante la diástole ventricular, una vez que se han abierto las válvulas auriculo-ventriculares, aunque la contracción (sístole) auricular contribuye de forma activa al llenado ventricular.

Los ventrículos desarrollan la fuerza necesaria para bombear la sangre a través de la arteria pulmonar (ventrículo derecho) y de la aorta (ventrículo izquierdo), razón por la que sus paredes son mucho más gruesas que las de las aurículas. Dado que la sangre sólo fluye desde zonas de presión más alta a las de presión más baja, para poder expulsar la sangre, es necesario que la presión intraventricular aumente y supere la presión existente en la arteria pulmonar y en la aorta. Aunque cada ventrículo bombea la misma cantidad de sangre, la circulación pulmonar es un circuito corto y de baja presión, mientras que la circulación sistémica es un circuito más largo y que presenta una presión y una resistencia al flujo sanguíneo cinco veces mayor. Por ello, el trabajo que debe realizar el ventrículo izquierdo es de 5 a 7 veces mayor que el efectuado por el derecho, por lo que no resulta sorprendente que la pared muscular del ventrículo izquierdo sea más gruesa (8-12 mm) que la del ventrículo derecho (3-4 mm)¹.

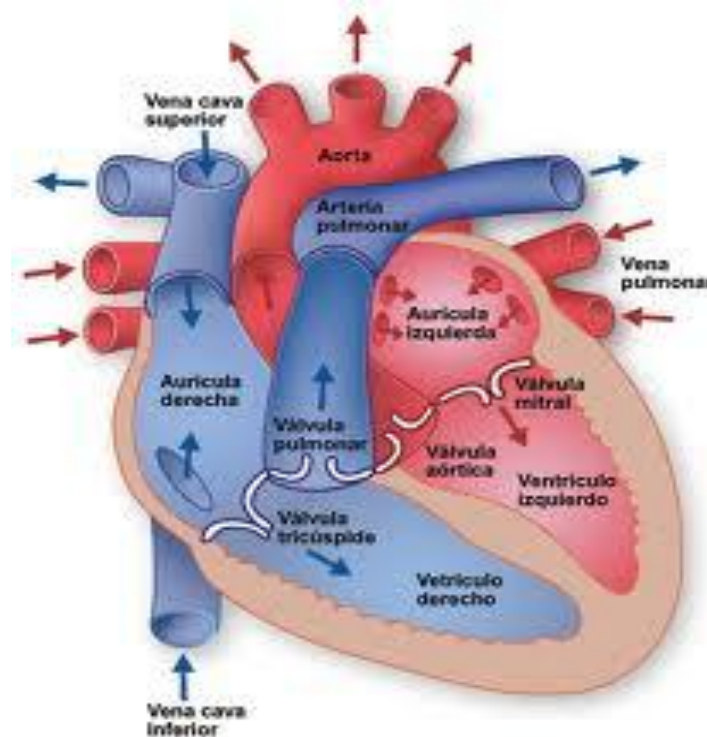


Figura 1. Anatomía macroscópica del corazón.

1.1.2.- Microscópica

El corazón es un órgano constituido por células musculares estriadas de pequeño tamaño (10-25 μm de ancho y unos 50-100 μm de longitud), que se ramifican y poseen uno o dos núcleos. El citoesqueleto es una red tridimensional de proteínas que

polimerizan en estructuras filamentosas que conectan los sarcómeros entre sí, el sistema contráctil a la membrana celular y las células a las estructuras extracelulares. Además, estabiliza la forma de la célula y organiza los orgánulos en el citoplasma, con lo que se mantiene la proximidad entre canales, bombas (ATPasas) y orgánulos celulares. Está formado por microfilamentos (constituidos por filamentos de actina), filamentos intermedios (constituidos por desmina, que une las líneas Z a los desmosomas, queratina y vimentina) y microtúbulos (compuestos por dímeros de tubulina). Las células cardíacas se unen entre sí a través de discos intercalares, los cuales contienen:

- a) desmosomas, compuestos por glicoproteínas integrales de la familia de las cadherinas que a través de sus dominios extracelulares se unen a los de otras células vecinas e impiden su separación durante la contracción cardíaca, y por sus dominios citosólicos se fijan en los filamentos intermedios.
- b) fascia adherens, que contiene proteínas (α -actinina, vinculina, N-cadherina) que anclan los filamentos de actina a la membrana de la propia célula y de las células adyacentes.
- c) uniones estrechas (gap junctions), que forman canales (conexinas) que permiten la libre difusión de iones y la rápida propagación del impulso cardíaco de una célula a la siguiente. Por tanto, los discos intercalares permiten el acoplamiento eléctrico de las células cardíacas y que el músculo cardíaco se comporte como un sincitio funcional.

En sentido paralelo al eje longitudinal de la célula cardíaca se disponen las miofibrillas, que contienen los filamentos contráctiles, y ocupan el 50% del volumen celular, mientras que las mitocondrias ocupan el 30-40%. Esta riqueza en mitocondrias se explica por la naturaleza aerobia del metabolismo del músculo cardíaco. A intervalos de 1.6-2.5 μm se encuentran las líneas Z, las cuales subdividen las miofibrillas y delimitan la unidad funcional de la célula muscular, denominada sarcómero (Figura 2). A cada lado de las líneas Z se localizan los filamentos finos de actina y en el centro del sarcómero, colocados entre los filamentos de actina, se disponen los filamentos gruesos de miosina. Como consecuencia de esta disposición, las miofibrillas muestran al

microscopio bandas claras y oscuras dispuestas según un patrón que se repite periódicamente, lo que confiere al músculo cardíaco su típica morfología estriada. A cada lado de la línea Z se encuentran las bandas I que sólo contienen filamentos finos, por lo que aparecen más claras al microscopio. Las bandas A, más oscuras, contienen los filamentos gruesos y los extremos de los filamentos finos. En la banda A es posible distinguir una zona más clara (banda H), la cual corresponde al espacio que existe entre los extremos de los filamentos finos y contiene la porción central de los filamentos gruesos.

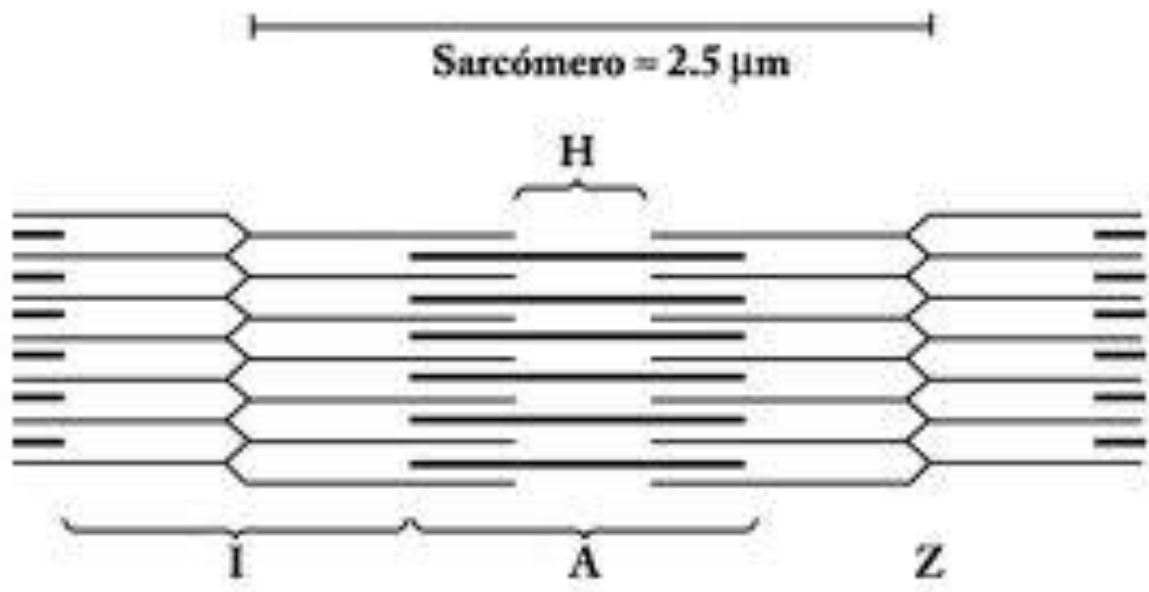


Figura 2. Organización estructural del sarcómero.

Durante la contracción cardíaca la longitud de los filamentos de actina y de miosina no se modifica, aunque la longitud del sarcómero sí se acorta. Ello es porque durante la contracción se forman, de manera repetida, enlaces cruzados entre la miosina y la actina, los cuales producen un deslizamiento progresivo de los filamentos de actina entre los de miosina hacia el centro del sarcómero. Como consecuencia, las bandas I se estrechan y las líneas Z se acercan, aunque la longitud de las bandas A permanece constante. Durante la relajación los filamentos de miosina y actina se separan y el sarcómero recupera su longitud inicial.

La célula cardíaca está rodeada por una membrana externa, el sarcolema, que se invagina a nivel de las bandas Z en una red de finos túbulos (300 µm de diámetro) que penetran en sentido perpendicular al eje de la célula hacia la profundidad de la

misma. Son los denominados túbulos transversos (T), a cuyo nivel se acumulan los canales de Ca^{2+} tipo L.

Estos canales presentan una alta conductancia por lo que constituyen la principal vía de entrada de Ca^{2+} en los miocitos cardiacos. En sentido perpendicular a los tubulos T y en estrecho contacto con ellos (a una distancia de 8-10 nm) se dispone una red tubular longitudinal, el retículo sarcoplásmico, que rodea cada miofibrilla y almacena importantes cantidades de Ca^{2+} . La estrecha relación entre los canales de Ca^{2+} , los túbulos T y el retículo sarcoplásmico juega un importante papel en el acoplamiento excitación-contracción cardíaco.

1.2. Potencial de acción cardíaco

A ambos lados de la membrana lipoproteica que separa los medios intracelular y extracelular existe una diferencia de potencial, que se conoce como Pm. Cuando una célula muscular cardíaca no se estimula el valor del Pm se mantiene constante y recibe el nombre de potencial de reposo. El potencial de reposo oscila entre -80 y -90 mV en las células musculares auriculares y ventriculares, y en el sistema de His-Purkinje, y entre -60 y -50 mV en las células de los nodulos senoauricular y auricoventricular. Si en estas condiciones se aplica un pulso despolarizante se desplaza el Pm hacia valores menos negativos, y si se alcanza un determinado nivel, que se denomina potencial umbral, se produce un cambio reversible del Pm de las células cardíacas al que se conoce como potencial de acción cardíaco (Figura 3).

El potencial de acción es el resultado de múltiples cambios secuenciales en la permeabilidad de la membrana a los iones Na^+ , Ca^{2+} y K^+ (Figura 3). La entrada/salida de éstos se produce a través de distintos tipos de canales iónicos que se activan por: cambios de voltaje (dependientes del voltaje), tras la interacción de un agonista con su receptor específico localizado en la superficie de la membrana celular (receptordependientes), por mediadores intracelulares (Ca^{2+} , ATP, nucleótidos cíclicos, proteína quinasa, eicosanoides) o en respuesta a factores físicos (estiramiento de los miocitos). La activación o apertura de dichos canales genera corrientes iónicas que, a su vez, modifican el Pm y la composición del medio intracelular. La entrada de cargas positivas en la célula produce la despolarización del Pm, mientras que su salida facilita la repolarización cardíaca.

El potencial de acción cardíaco se inicia con una fase 0 de rápida despolarización. En las células musculares auriculares y ventriculares y del sistema de His-Purkinje la fase 0 es debida a la activación-apertura de los canales del Na^+ voltajedependientes. La entrada de Na^+ en favor de su gradiente de concentración al interior celular genera una corriente rápida de entrada de Na^+ que despolariza el Em desde el nivel de potencial de reposo hasta un valor de $\approx +30 \text{ mV}$.

En las células cardíacas el proceso de repolarización es muy lento, lo que explica el porqué de la duración del potencial de acción cardíaco el cual es mucho más prolongado (170-350 ms) que el de las células nerviosas o musculares esqueléticas (1-10 ms).²

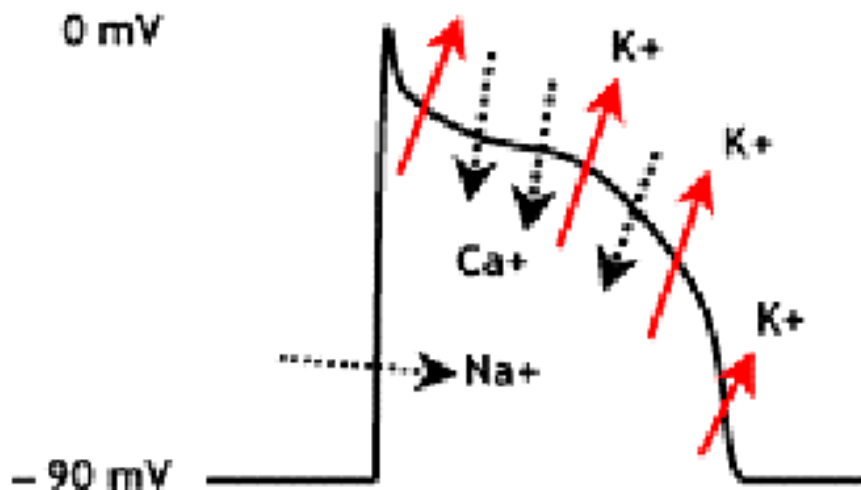


Figura 3. Representación esquemática del potencial de acción cardíaco.

1.3. Acoplamiento excitación/contracción

La función primordial del corazón es contraerse de forma rítmica y ordenada para generar en las cavidades cardíacas la presión necesaria para enviar un volumen de sangre oxigenada adecuada a las necesidades metabólicas de los tejidos. La función de bomba que ejerce el corazón depende de la contracción y relajación sincronizada de las aurículas y ventrículos y de la función de las válvulas auriculoventriculares y semilunares que regulan el flujo de la sangre a través del corazón, lo cual se traduce en cambios de presión, flujo y volumen de sangre durante el ciclo cardíaco.

El ciclo cardiaco comprende la sucesión de fenómenos eléctricos y mecánicos, así como los cambios en presión, flujo y volumen de sangre que tienen lugar en las cavidades auriculares y ventriculares durante cada latido cardiaco. En el ciclo cardiaco se distinguen dos fases: la diástole, durante la cual las cavidades cardíacas se relajan y se llenan de sangre, y la sístole, durante la cual las aurículas y los ventrículos se contraen, expulsando la sangre hacia los ventrículos y hacia la circulación pulmonar y sistémica, respectivamente. En cualquier caso, debemos recordar que el flujo de sangre a través de las cavidades cardíacas está controlado por cambios de presión, pasando de la zona donde la presión es más alta hacia aquella en la que es más baja.

El ciclo cardiaco se inicia con la generación de un potencial de acción en las células del nódulo sinoauricular que despolariza ambas aurículas. Durante la sístole auricular izquierda la presión intraauricular aumenta hasta 0.5 a 1.1 kPa (4 a 8 mmHg), y como las válvulas auricoventriculares están abiertas, una cantidad adicional de sangre pasa al ventrículo, produciéndose un aumento transitorio de las presiones auriculares (onda a) y ventriculares, así como del volumen ventricular. Dado que la sístole auricular aumenta el volumen de sangre que llena el ventrículo, se incluye dentro de la diástole ventricular. Durante la contracción de la aurícula derecha, la sangre que no puede entrar en el ventrículo derecho refluye hacia las venas cavas, dando lugar a la onda a del pulso venoso.

En condiciones fisiológicas, el 85% del llenado diastólico ventricular tiene lugar antes de la contracción auricular, por lo que ésta contribuye sólo en un 15% al mismo. Sin embargo, cuando se necesita aumentar el volumen minuto cardiaco (p. ej. durante el ejercicio), la sístole auricular desempeña una función importante en el llenado ventricular³.

1.4.- Proteínas contráctiles

Las principales moléculas que participan en el ciclo de contracción y relajación son las dos proteínas contráctiles más importantes, el filamento fino de actina y el filamento grueso de miosina. Existe otra proteína elástica grande, la titina, que sujeta a la miosina (Figura 4).

Los iones de calcio inician el ciclo de contracción al interactuar con la troponina C y romper la inhibición que, de otra manera, ejerce la troponina I (Figura 5). Durante la contracción, los filamentos se deslizan entre sí sin que las moléculas de actina o de miosina lleguen, en realidad, a acortarse. Conforme se van deslizando, tiran al unísono de los dos extremos de la unidad contráctil fundamental, el sarcómero. Según los filamentos de actina se van desplazando al centro del sarcómero, las líneas Z se van aproximando y el sarcómero se acorta. La energía para este acortamiento procede de la descomposición del ATP (adenosin trifosfato), fabricado fundamentalmente en las mitocondrias.

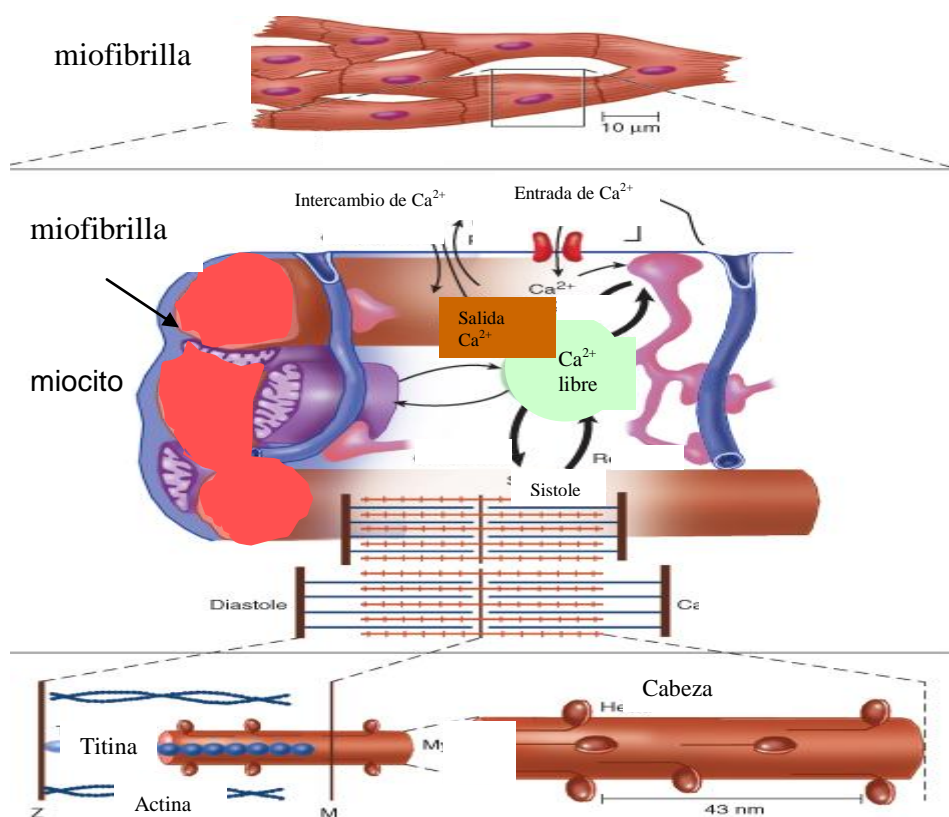


Figura 4. Célula miocárdica y fibra muscular. Esquema de la entrada de Ca^{2+} por el canal de calcio, que se abre en respuesta a la onda despolarizante que recorre el sarcolemma. Proteínas contráctiles.

Cada cabeza miosínica representa el extremo de una cadena pesada. Los cuerpos de dos de estas cadenas se entrelazan y cada uno termina en un “cuello” corto que transporta la cabeza elongada de miosina (Figura 5). Cada lóbulo de la cabeza bilobulada posee una bolsa de unión al ATP y una hendidura estrecha que se extiende

desde la base de esta bolsa hasta la superficie de unión a la actina⁴. El ATP y sus productos de descomposición ADP (adenosin difosfato) y P (fósforo inorgánico) se unen a la bolsa de ATP, muy próxima a la zona de actividad ATPasa de la miosina que descompone el ATP en sus productos (Figura 5).

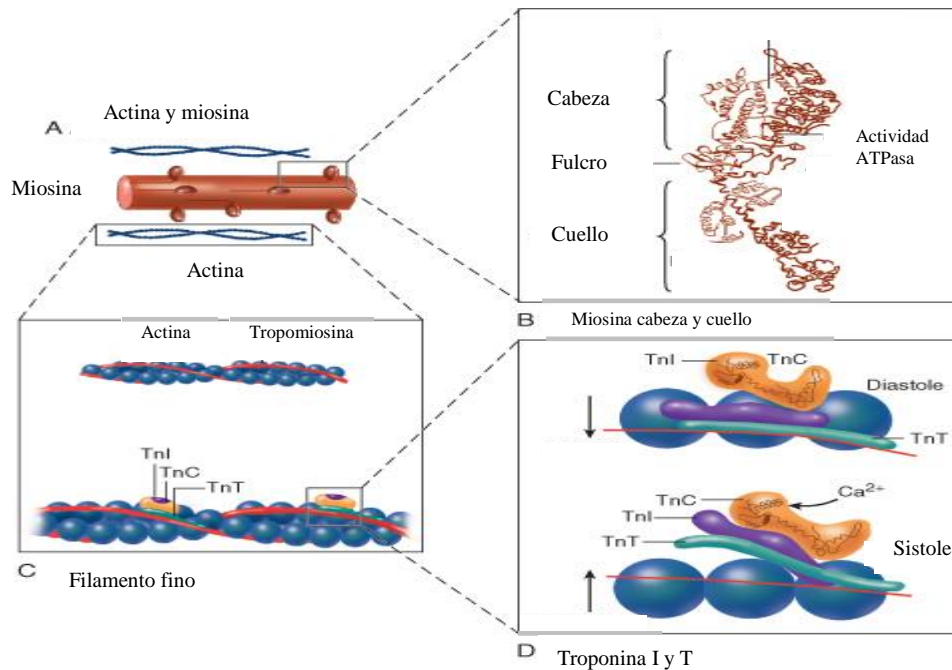


Figura 5. Principales moléculas del sistema contráctil. El filamento fino de actina (A) interactúa con la cabeza de miosina (B) cuando los iones de Ca^{2+} alcanzan la troponina C (C). La unión del calcio a la troponina C induce un cambio en su conformación y provoca su elongación (D).

Si se parte del estado de rigidez, la unión del ATP a su bolsa cambia la configuración molecular de la cabeza miosínica, de modo que ésta se despegue de la actina y acabe con la rigidez. Seguidamente, la actividad de la ATPasa de la cabeza miosínica escinde el ATP en ADP y P y la cabeza se flexiona. A medida que se hidroliza el ATP, la cabeza de miosina se une a la unidad adyacente de actina. Luego, libera P desde la cabeza hacia la hendidura y ocurre una fuerte unión entre la cabeza de miosina y la actina. Acto seguido, la cabeza se extiende, es decir, se endereza. En ese momento se lanza un impulso contráctil, la molécula de actina se desplaza y la cabeza de miosina pasa al estado de rigidez. La bolsa libera entonces ADP y se dispone a aceptar el ATP y a repetir el ciclo. La actividad ATPasa de la miosina responde al calcio, de manera que todo incremento en la concentración del calcio, asociada al ciclo

de contracción del corazón, multiplica varias veces esta actividad, además de aumentar la unión del calcio a la troponina C y el desarrollo de la fuerza⁵. Se precisa una estructura bicefálica para el desplazamiento completo de la actina (en unos 10 nm frente a los 6 nm obtenidos con una sola cabeza de miosina)⁶.

2.- EL METABOLISMO ENERGÉTICO DEL CORAZÓN NORMAL

La actividad cardíaca requiere un elevado y continuo aporte de energía, por lo cual, a diferencia del músculo esquelético, presenta permanentemente un metabolismo aeróbico. Esto explica que las mitocondrias representen aproximadamente la mitad del volumen celular cardíaco⁷.

2.1- Captación de ácidos grasos por las células cardíacas

La mayor parte del acetil CoA (Coenzima A) que oxidan las mitocondrias del tejido cardíaco normal se deriva del catabolismo de ácidos grasos, particularmente oleico y palmítico⁸. Los ácidos grasos son aportados al músculo cardíaco por la sangre, donde se encuentran como ácidos grasos libres (formando complejos con albúmina), o como triacilgliceroles (combinaciones de glicerol con ácidos grasos), formando parte de los quilomicrones o de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Los quilomicrones son lipoproteínas que se forman en el intestino durante el pospandrio y transportan triacilgliceroles y otros componentes lipídicos de la dieta, mientras que las VLDL transportan triacilgliceroles formados en el hígado a partir de los excedentes de glucosa procedentes de la dieta⁹.

La extracción de ácidos grasos a partir de quilomicrones y VLDL requiere la previa hidrólisis de sus triacilgliceroles, catalizada por la enzima denominada lipoproteína lipasa, que se localiza en su forma activa en el endotelio vascular. Una vez libres, los ácidos grasos son captados por los cardiomiocitos, donde se forman complejos con las llamadas proteínas asociadoras de ácidos grasos, las cuales son necesarias para mantener estables a los ácidos grasos en el medio acuoso dado el carácter fuertemente hidrofóbico de las cadenas de carbonos de dichas sustancias¹⁰. Los requisitos para que los ácidos grasos sean catabolizados son su activación, es decir, la combinación de su grupo carboxilo (-COO) con CoA, generando los derivados acil CoA correspondientes, y la internalización de éstos a la matriz mitocondrial. En el

citoplasma de las células cardíacas y de otros tejidos se ha encontrado un grupo de proteínas asociadoras de acil CoA, que como indica su nombre, unen específicamente derivados de acil CoA, a diferencia de las proteínas asociadoras de ácidos grasos, que unen tanto ácidos grasos como derivados de acil CoA⁸.

La activación de los ácidos grasos de cadena larga en el corazón ocurre por la acción catalítica de la enzima acil CoA sintetasa, localizada en la cara citosólica de la membrana mitocondrial externa. Los derivados acil CoA pueden tener dos destinos: uno, ser integrados a las mitocondrias para su inmediata oxidación, y dos, formar triacilglicerol de almacenamiento en la célula cardíaca. Se ha documentado la existencia de este almacén lipídico en los cardiomiocitos, el cual constituye una reserva fácilmente utilizable cuando disminuye el aporte extracelular de ácidos grasos¹¹.

La transferencia de los grupos acilos a la matriz mitocondrial es un proceso que no ocurre de manera directa, debido a la impermeabilidad de la membrana interna de las mitocondrias a los derivados de acil CoA. Dicha membrana presenta un translocador de derivados de acil-carnitina, para cuya utilización se requiere cambiar la CoA de los derivados acil CoA, por carnitina, lo cual ocurre por catálisis de la enzima denominada carnitina palmitoil transferasa I (CPT-I), la cual se localiza en la cara interna de la membrana mitocondrial externa⁸. Entonces, la proteína carnitina acilcarnitina translocasa, presente en la membrana mitocondrial interna, introduce a la matriz mitocondrial el derivado acilcarnitina al tiempo que saca de ella una molécula de carnitina (proceso antiportador). Finalmente, la enzima carnitina palmitoil transferasa II (CPT-II) revierte la reacción catalizada por la CPT-I. El proceso global equivale a transferir los derivados de acil CoA al interior de las mitocondrias (Figura 6).

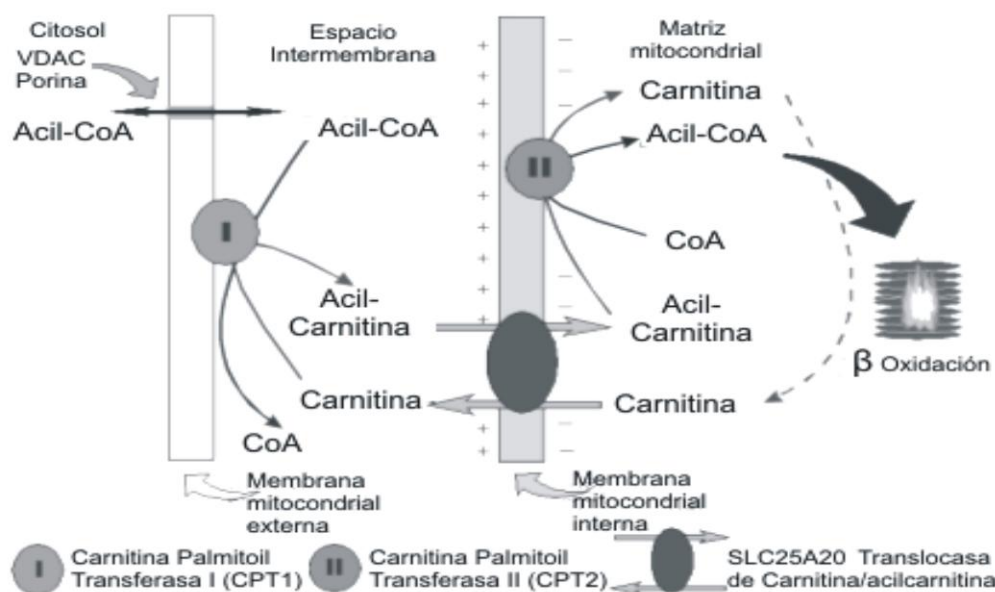


Figura 6. Incorporación de los grupos acilo a la matriz mitocondrial a través del sistema antiportador de la carnitina-palmitoil transferasa.

2.2- β -oxidación de los ácidos grasos

El catabolismo de los derivados de acil CoA para formar acetil CoA es un proceso conocido comúnmente como β -oxidación debido a la oxidación gradual que durante dicha vía sufre el carbono β de los ácidos grasos (Figura 7). El proceso consiste en una serie de reacciones que permite la separación de dos carbonos de la molécula original en forma de acetil CoA después de que el carbono β se oxide a grupo ceto. El grupo acil CoA resultante, con dos carbonos menos que el grupo acil CoA original, reinicia otra vuelta de la β -oxidación, al cabo de la cual perderá también dos carbonos que aparecerán como una segunda molécula de acetil CoA, y así sucesivamente hasta que el grupo acil CoA original haya sido catabolizado completamente a moléculas de acetil CoA. Debido al carácter claramente oxidativo de esta vía metabólica, en cada vuelta se quita hidrógeno de ciertos intermediarios, el cual es captado por cofactores como FAD (flavina adenina dinucleótido) y NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido) para ser cedido en última instancia a la cadena respiratoria y propiciar así la síntesis de ATP^{12} . Sin embargo, la mayor parte de la energía del ácido graso original se encuentra contenida todavía en el acetil CoA producto de la β -oxidación, debiendo ser catabolizada a través del ciclo de Krebs (Figura 8) para que finalmente su energía sea captada como ATP.

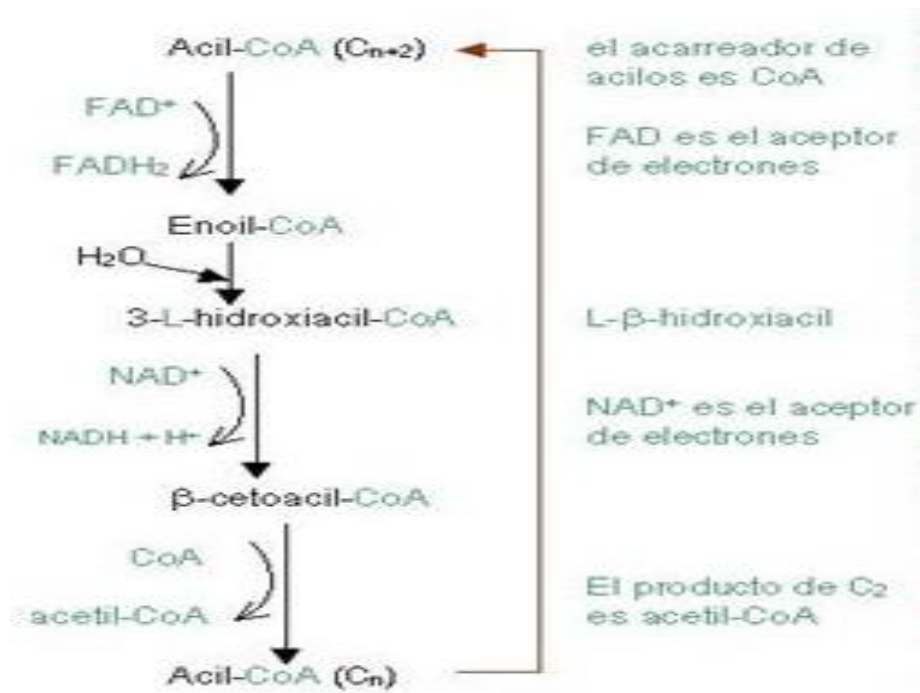


Figura 7. Visión general de la β -oxidación de ácidos grasos.

En este sentido ha sido descrito en la bibliografía que entre el 60-90% de los requerimientos energéticos del corazón los satisface la oxidación de ácidos grasos de cadena larga^{13, 14}.

2.3- El ciclo de Krebs en el metabolismo cardiaco

En la matriz mitocondrial ocurre la ruta aeróbica por excelencia del metabolismo energético, es decir el ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico, proceso que es alimentado por acetil CoA que deriva no solamente de los glúcidos sino también de los ácidos grasos y de los aminoácidos (Figura 8). El ciclo de los ácidos tricarboxílicos es una secuencia de reacciones que tiene efecto de un modo prácticamente universal en los organismos aeróbicos. En cada vuelta del ciclo desaparece una molécula de acetilo (CH_3-CO-) y aparecen dos moléculas de dióxido de carbono al tiempo que en cinco reacciones se generan coproductos de alto potencial energético (Figura 8). Está catalizada por un sistema multienzimático que acepta el grupo acetilo del acetil CoA como combustible, degradándolo hasta dióxido de carbono y átomos de hidrógeno. Estos últimos son conducidos a través de una secuencia de proteínas transportadoras de

electrones hasta el oxígeno molecular, que se reduce para formar agua. Este proceso de transporte electrónico hasta el oxígeno molecular se realiza con un descenso enorme de energía libre, gran parte de la cual se conserva gracias a la fosforilación del ADP para dar ATP en el proceso llamado fosforilación oxidativa.

En tres de ellas el cofactor enzimático NAD^+ se reduce; en una se reduce el cofactor FAD, y en una más se forma GTP (guanosin trifosfato) a partir de GDP (guanosin difosfato) y P. Los cofactores reducidos NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducido) y FADH₂ (flavina adenina dinucleótido reducido) transfieren su hidrógeno a la cadena respiratoria, localizada en la membrana mitocondrial interna, con lo cual se activa un mecanismo complejo que concluye con la síntesis de ATP a partir de ADP y P con la participación de la ATP sintasa.

Las reacciones enzimáticas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos tienen lugar dentro del compartimiento interno de la mitocondria. Algunas de las enzimas del ciclo aparecen en la matriz soluble del compartimiento interno, mientras que otros se hallan ligados a la membrana mitocondrial interna. Algunos de las enzimas del ciclo, en particular la aconitato hidratasa, la isocitrato deshidrogenasa, fumarasa y la malato deshidrogenasa se encuentran también en el citosol de algunos tejidos.

Muchas de las enzimas del ciclo de Krebs son reguladas por retroalimentación negativa, por unión alostérica del ATP, que es un producto de la vía y un indicador del nivel energético de la célula. Entre estas enzimas, se incluye el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) que sintetiza el acetil-CoA necesario para la primera reacción del ciclo a partir de piruvato, procedente de la glucólisis, del catabolismo de aminoácidos o de ácidos grasos. También las enzimas citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa, que catalizan las tres primeras reacciones del ciclo de Krebs, son inhibidas por altas concentraciones de ATP. Esta regulación frena este ciclo degradativo cuando el nivel energético de la célula es bueno.

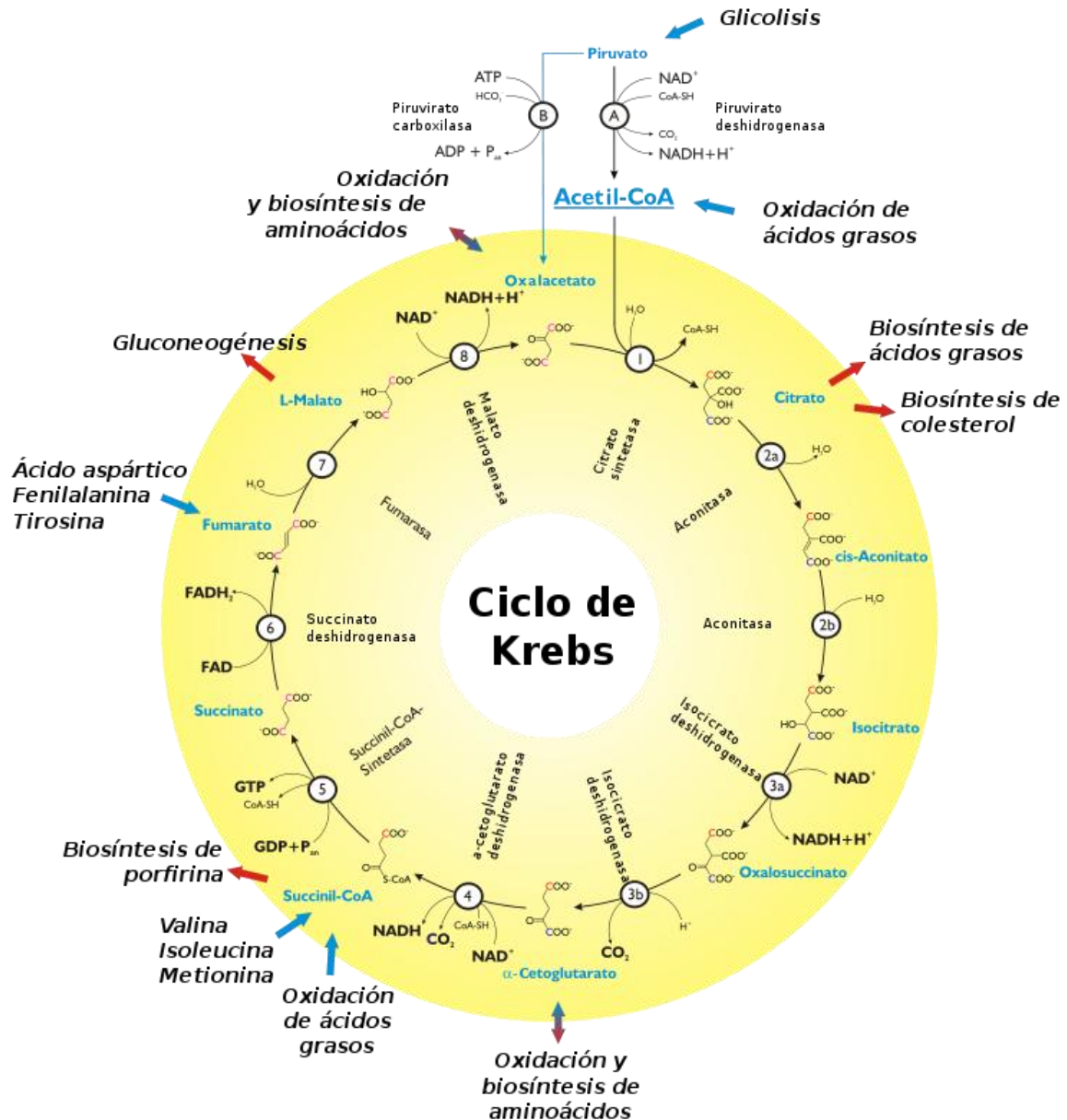


Figura 8. Ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarboxílicos

2.4.- Variaciones de las fuentes energéticas en el corazón

2.4.1.- Glucólisis y formación de lactato

Diversas evidencias experimentales han demostrado que el bajo porcentaje del requerimiento energético que no es cubierto por los ácidos grasos es satisfecho en las mismas proporciones por la glucosa y el lactato⁸. La utilización de glucosa se ve

incrementada en situaciones con elevadas cantidad de insulina, como en la fase posprandial, esto es debido a la elevada expresión del transportador de glucosa Glut-4, como respuesta al incremento de insulina circulante¹⁵. Otra situación en la que se ve incrementada la utilización de la glucosa es la hipoxia, que estimula la captación de forma mucho más eficaz que la insulina. La glucosa se oxida a través de la glucólisis, la cual es la secuencia de reacciones que convierte la glucosa en piruvato con la producción concomitante de una cantidad relativamente pequeña de ATP. El piruvato obtenido a raíz de la oxidación de la glucosa constituye la mayor fuente de energía derivada de la glucosa. El piruvato en presencia de oxígeno es descarboxilado oxidativamente, convirtiéndose en acetil CoA, este acetil CoA iniciará el ciclo de Krebs. La descarboxilación del piruvato por la que se obtiene acetil CoA está catalizada por un complejo enzimático llamado PDH, y en esta reacción también se libera dióxido de carbono y NADH.

La PDH está regulada por la cantidad de acetil CoA disponible en la mitocondria. Cuando hay una alta concentración de acetil CoA, debido a abundancia de ácidos grasos circulantes, se inhibe la PDH; por el contrario si disminuye la presencia de acetil CoA en la mitocondria (disminución de oxidación de ácidos grasos) se activa el complejo PDH, estimulándose la vía glicolítica de la glucosa. Por tanto, es aceptado por la comunidad científica que la disponibilidad de ácidos grasos constituye el factor principal que determinará la necesidad de la utilización de fuentes alternativas de energía como son la glucosa o el lactato. En este sentido Goodwin y cols, demostraron que la demanda energética generada por el incremento agudo y de corta duración del trabajo cardíaco (inducido por estímulo con epinefrina), era satisfecha fundamentalmente por el catabolismo de la glucosa derivada del glucógeno almacenado en los miocitos¹⁶.

Otro hallazgo interesante descrito recientemente fue el papel que jugaba el ritmo circadiano en el metabolismo energético cardíaco. Young y cols, describió en corazones aislados de ratas un incremento de la actividad cardíaca, asociada con un aumento del consumo de oxígeno y de la oxidación de la glucosa y lactato, pero no de ácidos grasos a la mitad de la fase nocturna, pero la situación era la inversa en la fase diurna¹⁷.

2.4.2.- Cuerpos cetónicos

Los cuerpos cetónicos son compuestos químicos (acetoacetato y β -hidroxibutirato); producidos por cetogénesis en la mitocondria hepática, cuando hay una estimulación prolongada e intensa del proceso lipolítico, es decir la hidrólisis de triacilglicerol¹².

En condiciones tales como el ejercicio físico prolongado o el ayuno, el organismo emite señales de alto requerimiento energético. En estas condiciones se liberan a la circulación cuerpos cetónicos, el tejido muscular cardiaco es capaz de utilizar los cuerpos cetónicos transformándolos en acetil CoA para la síntesis de ATP mediada por el ciclo de Krebs.

2.4.3.- Creatinina-fosfoquinasa

En aquellas condiciones en las que en el tejido muscular la síntesis de ATP se ve limitada, se produce la desfosforilación de la fosfocreatina para producir una molécula de ATP, esta reacción está catalizada por la enzima creatina-fosfoquinasa. La fosfocreatina constituye un reservorio energético, generado a partir de creatina y ATP en períodos de bonanza energética¹⁸.

2.4.4.- Adenilato quinasa

En situaciones de déficit energético, en el que son abundantes las moléculas de ADP, actúa una enzima denominada adenilato quinasa, que cataliza la reacción entre pares de moléculas de ADP, formándose una molécula ATP y otra de AMP (adenosin monofosfato). Esta reacción permite aprovechar la energía contenida en el ADP. Durante el ejercicio muy intenso el aporte de ATP mediado por la adenilato quinasa hace posible mantener el esfuerzo durante intervalos importantes de tiempo¹⁹.

3.- ALTERACIONES DEL METABOLISMO ASOCIADAS A PATOLOGÍAS CARDIACAS

Según se ha podido extraer de los puntos anteriores el metabolismo cardiaco es mayoritariamente aeróbico, ya que requiere un aporte energético que solamente se

puede satisfacer con la oxidación completa de los combustibles biológicos anteriormente señalados. Sin embargo, hay situaciones o patologías cardíacas que hacen que su metabolismo energético se vea dañado, llegando incluso a la muerte miocitaria por déficit energético en estas células. Estos estudios muestran como el metabolismo energético cardíaco es susceptible de cambiar de vía metabólica en respuesta a un déficit energético. Por ejemplo, el lactato es un sustrato más importante para la generación de energía en situación patológica que en el estado normal²⁰. Por tanto, existe una enorme polémica en torno a si la fosforilación oxidativa mitocondrial se encontraría alterada.

3.1.- Metabolismo energético en corazón hipertrófico

3.1.1.- Metabolismo glucídico en la hipertrofia miocárdica

El corazón hipertrófico tiene un incremento del metabolismo glucídico debido a la aceleración de la glucólisis. En el corazón fetal hay un aumento de la disponibilidad de NADH, que acompaña al incremento de la actividad del transportador de malato-aspartato y a la expresión del transportador malato-oxoglutarato, el cual es clave en este proceso. Sin embargo, no pudo demostrarse el incremento del transportador en el corazón hipertrófico. Se propuso que la capacidad propia de la lanzadera basta para la metabolización del NADH o que podrían existir mecanismos alternativos no identificados. Tampoco se hallaron otras modificaciones del metabolismo glucídico en el corazón hipertrófico. Si bien, en modelos experimentales, se encontró un aumento de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, la cual incrementa la síntesis de lactato, no pudo demostrarse que aumente la oxidación del lactato en el corazón hipertrófico.

El piruvato puede participar en las vías accesorias que proveen de hidratos de carbono al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, proceso denominado anaplerosis. Este metabolito puede ser carboxilado a malato u oxalacetato. En el corazón hipertrófico de las ratas se halló un incremento del flujo anaplerótico a expensas del incremento del

contenido de malato, lo que estaría avalado por el aumento de la expresión de la enzima málica que carboxila al piruvato. Sin embargo, esta vía disminuye la eficacia de la producción de ATP.

3.1.2.- Mecanismos potenciales del incremento de la dependencia de la glucosa

Está demostrado que durante la hipertrofia patológica del miocardio existe un cambio en la regulación de los genes que codifican las enzimas del metabolismo oxidativo mitocondrial. Se encontró una disminución de los receptores alfa inductores de la proliferación de peroxisomas (PPAR) y del coactivador 1 de los receptores gamma de la misma familia, los que están vinculados al control de los genes de la oxidación y la transferencia de los ácidos grasos, y a la proliferación mitocondrial. Además, está disminuida la enzima encargada de la transferencia de los ácidos grasos hacia la mitocondria. Por lo tanto, la reducción de la provisión citoplasmática y mitocondrial de los ácidos grasos sería responsable de la alteración del metabolismo de estos sustratos en el corazón hipertrófico. En los ratones carentes de PPAR se desarrolla un perfil metabólico similar al del corazón hipertrófico, mientras que la delección del coactivador 1 de los receptores gamma disminuye la expresión de las enzimas vinculadas a la fosforilación oxidativa y, por ende, se altera la síntesis de ATP.

El aumento del metabolismo glucolítico incrementa la captación de glucosa independiente de la insulina, lo que estaría mediado por la activación de la proteína-quinasa activada por el 5'adenosin-monofosfato, que a su vez se activa ante el trastorno energético del miocardio. Este mediador aumenta la translocación de transportadores para glucosa y estimula la glucolisis a través de la fosforilación y activación de la enzima fosfofructoquinasa (FFQ). Estos hallazgos son compatibles con la observación de que en el corazón hipertrófico, tanto el aumento de la glucolisis como el de la captación de glucosa son independientes de la insulina.

Como ya se había apuntado anteriormente, los corazones no hipertróficos (Figura 9) obtienen la mayoría de su energía de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga, con una contribución de la glucosa, lactato y otros sustratos endógenos^{21,22}. En el corazón hipertrófico (Figura 9) el ATP, es principalmente sintetizado en las

mitocondrias a través de la fosforilación oxidativa y utilizado por el aparato contráctil celular, principalmente es utilizado por la miosina ATPasa para generar fuerza. Algunos estudios han sugerido que la oxidación de ácidos grasos se ve reducida en corazones hipertróficos y que el corazón utiliza otros mecanismos de obtención de energía para mantener el aporte energético²³. En este sentido, se ha observado que en corazones hipertróficos una disminución de la β -oxidación de ácidos grasos se ve compensada con un aumento de la producción de ATP proveniente de la glucólisis²⁴. En un corazón hipertrófico la oxidación de ácidos grasos se ve reducida hasta un 30-40 % comparándolo con un corazón normal^{25,26,27}. Actualmente no se conoce con certeza el porqué de la reducción del principal mecanismo de obtención energética cardíaca, se han propuesto diferentes opciones, como la reducción de la expresión de enzimas oxidativas implicadas en la β -oxidación de ácidos grasos^{28,29} o alteraciones en el transporte y en la entrada a la matriz mitocondrial, así como a niveles anormalmente bajos de carnitina miocárdica.

Debido a la disminución de energía en corazones hipertróficos, numerosos autores han descrito un aumento significativo de la oxidación de la glucosa o glucólisis especialmente cuando el acetil-CoA miocárdico está disminuido como en el caso de los corazones hipertróficos^{30,31,32}. Sin embargo, este aumento de la glucólisis no está acompañado de la oxidación del producto final de esta ruta metabólica, el piruvato. En este sentido, hay algunos autores que han descrito una menor oxidación de glucosa en corazones hipertróficos comparándolos con los sanos^{33,34}.

Leong y cols, apuntó que la glucólisis en corazones con hipertrofia era un 10-15%, mientras que en corazones normales suponía entre un 20-25%³⁵.

Por otro lado, aunque es bien conocido que la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) conduce a insuficiencia cardíaca congestiva, los mecanismos de esta transición no han sido clarificados hasta la actualidad, en parte debido al desconocimiento de las proteínas asociadas a HVI. En este sentido la mayoría de los estudios han descrito en HVI variaciones en la expresión de proteínas asociadas al aparato contráctil celular³⁶. Sin embargo, los mecanismos de generación o regulación energética celular deberían ser también incluidos en el mecanismo de adaptación cardíaca. En este sentido, dado que el corazón tiene un requerimiento energético muy elevado, es predecible que los trastornos fisiológicos asociados con la hipertrofia cardíaca pudieran inducir una serie de adaptaciones que conllevaran una alteración del

metabolismo energético, provocando una disminución de la funcionalidad del miocardio hipertrófico.

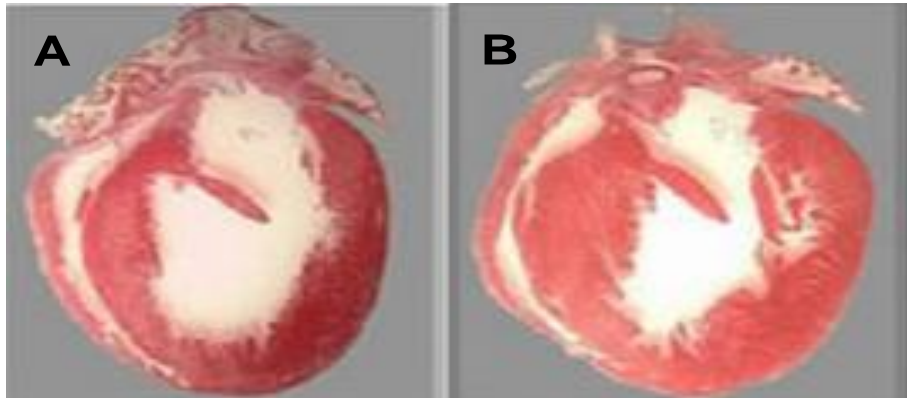


Figura 9. Corazón de rata anatómicamente normal (A) y corazón de rata hipertrófico (B). Se puede comprobar el cambio en el tamaño del corazón, que se corresponde con diferente masa ventricular izquierda.

3.2.- Metabolismo energético cardiaco en obesidad

Es importante señalar que el síndrome metabólico (SM) está íntimamente relacionado con la obesidad. La obesidad está normalmente acompañada de hipertensión, alteraciones lipídicas y resistencia a insulina por esto es importante pensar que los cambios en la función cardiaca y en el metabolismo pueden no deberse únicamente a la obesidad, sino a las patologías asociadas a esta obesidad.

Se ha descrito ampliamente en bibliografía que la obesidad incrementa el riesgo de patologías cardiovasculares³⁷ y lesión cardiaca³⁸. Sin embargo, aunque es conocida la relación entre obesidad y disfunción cardiaca no se sabe los mecanismos moleculares que los provocan. En este sentido recientes estudios han sugerido que la obesidad puede provocar alteraciones en el metabolismo energético del corazón, a través de una sobreestimulación de la oxidación de los ácidos grasos y de una acumulación lipídica cardiaca. Así también se ha descrito que la obesidad afecta tanto a la funcionalidad del sistema renina-angiotensina como a la vía adrenérgica^{39,40,41}.

3.2.1.- Acumulación lipídica cardiaca

Ya que en condiciones de obesidad existen elevados niveles de ácidos grasos, en forma de triglicéridos o ácidos grasos libres acoplados a albúmina, sería plausible pensar que podría darse una acumulación lipídica en el corazón⁴² produciéndose lipotoxicidad cardiaca, atribuible al desbalance existente entre la elevada cantidad de ácidos grasos y la limitada oxidación de éstos⁴³. Esta lipotoxicidad se ha visto que ocurre en el tejido muscular esquelético o el hígado, en los que un bajo ratio de oxidación de ácidos grasos originan acumulación lipídica llegando incluso a provocar resistencia a insulina^{44,45,46}. Sin embargo, múltiples estudios con modelos animales y en humanos, han descartado la posibilidad de una alteración funcional cardiaca debido a la acumulación de tejido graso. Estos estudios mostraron unos elevados ratios de oxidación de ácidos grasos, con una elevada producción de acetil CoA mediante la β -oxidación.

3.2.2.- Metabolismo de ácidos grasos en el corazón en condiciones de obesidad

Varios estudios han demostrado que aún habiendo una gran cantidad de ácidos grasos en sangre, en el corazón no se produce la acumulación de estos compuestos. Esto ha sido explicado por el significativo incremento de la oxidación de ácidos grasos en este tejido, además este aumento del metabolismo se ha asociado a una posible resistencia a insulina y diabetes tipo 2, debido a una hiperglucemia como consecuencia de alteraciones en la glucólisis.

Las vías por las que parece se estimula la β -oxidación mitocondrial en obesidad son varias:

3.2.2.1) Activación de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs)

Los PPAR son un grupo de proteínas pertenecientes a la familia de receptores de ubicación nuclear que se comportan como factores que modulan la transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN) al unirse a elementos de respuesta específicos de

ciertos genes blanco. Hasta el momento se han descrito cuatro tipos principales de PPAR designados como α , β , δ , γ ; estos receptores se encuentran involucrados en la regulación de diferentes procesos metabólicos como la β -oxidación. Los ácidos grasos son ligandos endógenos para los PPARs que a través de la síntesis de proteínas, disminuyen los niveles de ácidos grasos en el corazón^{47,48}. Por tanto, en una situación con elevados niveles de ácidos grasos, como es la obesidad, la activación de metabolismo de ácidos grasos estará sobreestimulada. En este sentido, los PPAR β/δ regulan la expresión de enzimas clave asociadas a la oxidación de los ácidos grasos⁴⁹.

3.2.2.2) Activación de carnitina palmitoil transferasa I (CPTI).

La CPTI es una enzima mitocondrial perteneciente a la familia de las carnitina acil transferasas, que facilita el transporte de ácidos grasos al interior mitocondrial. Esta enzima cataliza la reacción de unión de carnitina a ácidos grasos para su posterior entrada a la mitocondria a través de unos transportadores o translocadores mitocondriales⁸. Por tanto, esta enzima es fundamental para la iniciación de la oxidación de los ácidos grasos, ya que en función de los niveles de entrada de ácidos grasos se incrementará o disminuirá en gran medida la oxidación de ácidos grasos. La regulación de la CPTI está controlada por el primer intermediario en la síntesis de los ácidos grasos, la malonil CoA. La malonil CoA es un potente inhibidor de la CPTI y un importante marcador de oxidación cardiaca. La malonil CoA es sintetizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y es degradada por la malonil-CoA descarboxilasa⁵⁰⁻⁵³. A su vez, la ACC está controlada por la AMP-quinasa, la fosforilación de la ACC por la AMP-quinasa induciría una inactivación de la malonil-CoA, estimulándose la actividad de la CPTI, potenciándose por tanto la oxidación de los ácidos grasos.

3.2.3.- Metabolismo de la glucosa en obesidad

En situaciones con un alto ratio de oxidación de ácidos grasos, como lo es la obesidad, numerosos estudios han descrito una inhibición de la oxidación de la glucosa o glucólisis⁵⁴⁻⁵⁷ e incluso una resistencia a la insulina, como consecuencia de los elevados niveles glucosa. Estudios utilizando modelos animales han mostrado que un metabolismo de ácidos grasos anormalmente estimulado induce el desarrollo de

cardiomiopatías diabéticas debido a la inhibición, al menos parcialmente, de la glucolisis y a la disminución de la eficiencia mecánica cardíaca⁵⁸⁻⁶¹. Apoyando el resultado de estos estudios le han seguido una serie de publicaciones en las que se ha descrito una reactivación de la glucolisis seguida de una significativa mejora de la función contráctil cardíaca en animales diabéticos, tras el tratamiento con fármacos inhibitorios de la β -oxidación⁶²⁻⁶⁵.

Otro de los efectos del aumento de la oxidación de ácidos grasos es la inhibición de la oxidación de la piruvato mediada por la PDH que cataliza la formación de acetil-CoA. El acúmulo de piruvato es degradado a lactato de forma anaeróbica, esta generación de lactato genera hidrogeniones que acidifican el medio citoplasmático. En la célula, como respuesta fisiológica al aumento de protones, se produce un intercambio de iones a través de canales iónicos, generándose en última instancia una sobrecarga de iones calcio intracelular⁶⁶. En el transporte de iones para eliminar los hidrogeniones se consume energía (ATP), disminuyéndose la eficiencia cardíaca.

3.2.4.- Alteración de la síntesis de adipoquinas en obesidad

La obesidad afecta la secreción de algunas adipoquinas, específicamente se ha descrito que la obesidad incrementa la síntesis por parte del tejido adiposo de la leptina y disminuye la síntesis de adiponectina⁶⁷, las cuales tienen un importante impacto en el sistema vascular y en el corazón⁶⁸⁻⁷⁰. La adiponectina es una proteína de 247 aminoácidos (peso molecular: 30 kilodaltons) formando cuatro dominios, que es sintetizada exclusivamente por el tejido adiposo. Los niveles de adiponectina son significativamente más bajos en pacientes obesos comparados con controles no obesos, y están inversamente relacionados con el índice de masa corporal (IMC)^{71,72}. Aunque se sabe que la adiponectina tiene un efecto directo sobre el corazón, algunos estudios han mostrado que el tejido miocárdico expresa tres receptores Adipo R1, Adipo R2 y Cadherina T para la unión de esta adipoquina^{73,74}, no está claro el papel que desempeña la adiponectina sobre el corazón. En este sentido, Morabito y colaboradores describieron que la adiponectina estimulaba la oxidación de ácidos grasos en miocitos de ratas⁷⁵. Diferentes estudios han sugerido que la adiponectina estimula la activación de la enzima AMP-quinasa y que esta activación de AMP-quinasa es la causa del efecto estimulante de la adiponectina sobre la oxidación de los ácidos grasos. Sin embargo, las

conclusiones que se pueden extraer de estas evidencias experimentales relacionadas con la obesidad no están claras, ya que en pacientes obesos la adiponectina está significativamente disminuida, pero la β -oxidación de ácidos grasos está netamente incrementada.

3.2.4.1) Efectos cardiacos de la adiponectina

Existen evidencias experimentales de que la adiponectina podría tener un papel importante en la protección de patologías cardiacas como la HVI. Shibata y colaboradores, utilizando un modelo animal de ratones knockout para la adiponectina, describieron que la síntesis de adiponectina mejoraba la HVI y la mortalidad⁷⁶. Diferentes vías se han sugerido para explicar este efecto protector, así hay estudios que postulan que la protección ejercida por la adiponectina, es debida a la activación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en miocitos cardiacos, ya que la inhibición de esta enzima revirtió los efectos cardioprotectores de la adiponectina⁷⁷. Otra de las posibles vías relacionadas con los efectos de la adiponectina es la síntesis de NO (óxido nítrico) a través de la estimulación de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOS_e) por un mecanismo dependiente de AMP-quinasa^{78,79}. Sin embargo, a pesar de los aparentes efectos protectores de adiponectina sobre la hipertrofia cardiaca, también existe un clínico que muestra como elevados niveles de adiponectina están asociados con un incremento del riesgo de la mortalidad en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva.

3.2.4.2) Efectos cardiacos de la leptina

La leptina es una proteína de 167 aminoácidos, que incluye un péptido señal de 21 aminoácidos, su síntesis ocurre principalmente, aunque no de forma excluyente, a nivel del tejido adiposo blanco. Esta hormona está positivamente correlacionada con el IMC⁸⁰. La leptina tiene un amplio rango de órganos diana, en este sentido se ha sugerido que tiene efectos directos sobre el corazón, ya que han sido identificados receptores para la leptina en corazón, Ob-Ra, Ob-Rb y Ob-Re⁸¹.

Diferentes estudios han mostrado en corazón de rata, que la leptina incrementa la oxidación de ácidos grasos, pero que no altera el metabolismo de la glucosa⁸². El incremento de la oxidación de ácidos grasos está asociado con una disminución del

contenido de triglicéridos y un incremento del consumo de oxígeno miocárdico finalizando en una deficiencia o insuficiencia cardíaca. Interesantemente, Palanivel y colaboradores mostraron que la elevación de niveles de leptina no modificó el transporte de glucosa a través de los receptores GLUT ni la oxidación de la glucosa o la formación de glucógeno en cardiomiocitos⁸³. Otros estudios han sugerido un aumento del transporte de la glucosa en el músculo esquelético⁸⁴, sin embargo en nuestro conocimiento no hay estudios que hayan mostrado un aumento del transporte de la glucosa en el corazón. En este sentido, hay muy pocos estudios recientes, que hayan analizado el efecto directo de la leptina sobre enzimas representativas del metabolismo miocárdico, existiendo solo algún modelo animal deficiente en leptina genéticamente, en los que resulta difícil sugerir efectos directos de la leptina sobre el corazón.

3.3.- Metabolismo energético cardíaco en la resistencia a insulina y la diabetes

El transporte de la glucosa está deteriorado en corazones diabéticos⁸⁵⁻⁸⁸. Este deterioro en el transporte de la glucosa se ha explicado por la disminución en la concentración de transportadores GLUT 1 y GLUT 4 en el miocardio^{89,90}. También se ha descrito que la glucólisis está significativamente reducida en corazones de ratas diabéticas^{91,92}. Esta disminución de la oxidación de la glucosa está asociada a una acumulación intracelular de la glucosa-6-fosfato, y una disminución en la proporción fructosa 1,6-bifosfato/fructosa 6-fosfato⁹³. La FFQ es la enzima que cataliza la conversión de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bifosfato, y se caracteriza por la pérdida de actividad enzimática en presencia de altos niveles de citrato, y altos niveles de la ratio de ATP/ADP y/o NADH/NAD⁺. En este sentido, también se ha descrito que en corazones diabéticos se estimula la oxidación de ácidos grasos, esta β -oxidación genera una gran cantidad de citratos que contribuye a disminuir la actividad de la FFQ⁹⁴.

La baja concentración de insulina en pacientes con diabetes provoca una estimulación de la lipólisis en miocitos. Numerosos estudios han demostrado que la estimulación de la lipólisis, debido a los bajos niveles de insulina en diabetes, están directamente relacionados con el deterioro en el transporte de la glucosa y de la oxidación de ésta⁹⁵.

3.3.1.- Efectos de la resistencia a insulina y diabetes sobre la oxidación del piruvato

Numerosos estudios han demostrado que los niveles de oxidación tanto de la glucosa como del lactato están significativamente disminuidos en modelos animales de diabetes⁹⁶⁻⁹⁸. La reacción de descarboxilación del piruvato es el paso fundamental en la oxidación de carbohidratos y es catalizada por la PDH. La PDH es inhibida por elevados niveles de acetil CoA, NADH y ATP, por tanto una sobreestimulación de oxidación de ácidos grasos, como ocurre en individuos con diabetes provoca una disminución de la oxidación de carbohidratos, mediado por la inhibición de la PDH⁹⁹⁻¹⁰³

3.3.2.- Efectos de la resistencia a insulina y diabetes sobre la oxidación de ácidos grasos.

La principal fuente de energía para el corazón es aportada por los ácidos grasos libres unidos a la albúmina y los contenidos en los triglicéridos formando parte de los quilomicrones, ambas fuentes están aumentadas en condiciones diabéticas^{104,8}. Dos interesantes estudios, utilizando corazones de ratas diabéticas, revelaron que en condiciones de ausencia total de ácidos grasos, la oxidación de glucosa era muy baja aportando tan solo menos del 20% de los requerimientos de ATP para el corazón. Este dato sugiere que los altos niveles de ácidos grasos no son los únicos responsables de la baja oxidación de glucosa en corazones de ratas diabéticas. Algunos grupos de investigación han apuntado a alteraciones en la funcionalidad de la PDH o a alteraciones en los mecanismos de entrada de ácidos grasos en la mitocondria para explicar el aumento de la oxidación de ácidos grasos frente a la oxidación de la glucosa.

3.3.3.-Efecto de la resistencia a la insulina y la diabetes en la fosforilación oxidativa mitocondrial

También se ha descrito que la diabetes podría alterar la eficacia de la fosforilación oxidativa mitocondrial. En este sentido tres estudios han descrito deficiencias en la cadena transportadora de electrones en corazones de ratas diabéticas¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ lo que derivaría en una disminución de la producción de ATP. Sin embargo, varios trabajos han mostrado que aunque la respiración mitocondrial esté

deprimida en condiciones de diabetes, la media de producción de ATP no parece ser menor que la de un corazón sano.

4.- MIOCARDIOPATIA HIPERTENSIVA

La cardiopatía hipertensiva es la afectación del órgano diana que comporta mayor morbi-mortalidad en el paciente hipertenso¹⁰⁸. La hipertrofia cardiaca y concretamente la HVI es considerada como un mecanismo adaptativo frente al aumento de carga en pacientes con hipertensión, siendo considerada como una de las enfermedades más comunes del mundo¹⁰⁹. Desde un punto de vista celular, la HVI puede ser considerada el resultado final de un exagerado crecimiento de miocitos en respuesta a estímulos hemodinámicos y/o no hemodinámicos. Existen una gran cantidad de mecanismos que tratan de dar explicación a la generación de la hipertrofia cardiaca, en los que se incluye el desequilibrio entre la apoptosis y la generación celular miocárdica^{110,111}. También han sido descritos múltiples vías de señalización celular asociadas a la hipertrofia miocárdica¹¹², vías de los calcineurínicos, proteínas G, y otras¹¹³⁻¹¹⁵. Sin embargo, el mecanismo molecular que induce al remodelamiento celular en la hipertrofia miocárdica es desconocido en la actualidad. Todos los componentes histológicos del miocardio se afectan cuando se desarrolla la cardiopatía hipertensiva (Tabla 1), siendo la hipertrofia miocitaria, la fibrosis intersticial y la hipertrofia de la pared de las arterias intramiocárdicas las tres lesiones principales.

Estudios epidemiológicos han sugerido que la hipertrofia ventricular izquierda podría predecir un mal pronóstico para los pacientes con hipertensión principalmente a aquellos pacientes con factores de riesgo asociados a insuficiencia cardiaca congestiva, arritmias ventriculares y síncope^{116,117}. Se han identificado algunos marcadores como los péptidos natriuréticos y la isoforma beta de la cadena pesada de la miosina en la hipertrofia cardiaca o en el fallo cardiaco^{118,119}. Inclusive llegó a pensarse al inicio del estudio de la patología cardíaca, que la hipertrofia del corazón era un paso previo y necesario para el fallo cardiaco. Por tanto, la regresión de la hipertrofia cardiaca podría mejorar la función cardiaca y reducir la mortalidad y la morbilidad cardiaca^{120,121}.

Tabla 1. Diferentes lesiones asociadas al desarrollo de cardiopatía hipertensiva.

Lesión de los cardiomiocitos	Lesión del intersticio	Lesiones de los vasos coronarios
Hipertrofia	Aumento del número de células intersticiales	Alteraciones de la geometría de la pared de los vasos
Aumento de la apoptosis	Aumento del depósito de colágeno fibrilar y otras proteínas de la matriz extracelular	Disminución del número de arteriolas y capilares

4.1.- Mecanismos de estimulación de la hipertrofia cardiaca

La capacidad del miocardio para crecer depende principalmente de la síntesis proteica de los miocitos. Esta síntesis proteica está determinada por la cantidad de ribosomas presentes en el citoplasma celular y por un mecanismo denominado transcripción, por el que se genera el ARNm (ácido ribonucleico mensajero) correspondiente a cada gen, que posteriormente se traducirá a una proteína. Por tanto, el crecimiento miocárdico hipertensivo puede ser considerado como un proceso de estimulación de la transcripción de genes codificantes para proteínas del miocito en respuesta a una elevada presión sanguínea.

En la bibliografía más reciente, se han descrito numerosos factores estimulantes de la síntesis proteica en la hipertrofia ventricular izquierda, que pueden agruparse en mecanismos hemodinámicos y no hemodinámicos.

4.2.- Mecanismos hemodinámicos de la hipertrofia del ventriculo izquierdo

Diferentes mecanismos pueden inducir crecimiento o engrosamiento del miocardio debido a factores hemodinámicos en pacientes con hipertensión arterial. Numerosos estudios han descrito que el engrosamiento de la pared ventricular, debida al aumento de la presión intraventricular, acelera el proceso de síntesis proteica y disminuye la degradación proteica^{122,123}. Este ensanchamiento de la pared ventricular es una variable mecánica relacionada directamente con el crecimiento celular miocárdico durante la sobrecarga hemodinámica¹²⁴

4.2.1.- Mecanotransducción

El ensanchamiento mecánico y la deformación celular generan una gran cantidad de señales celulares que modifican el ratio de ARNm y por tanto de la síntesis y degradación proteica, e inclusive puede modificar la actividad proteica. El ensanchamiento del miocardio estimula la señalización de crecimiento celular, se ha descrito que un aumento de la presión aórtica incrementa el contenido de AMPc (adenosin monofosfato cíclico) citoplasmático, que estimula la actividad de proteínas-quinasas dependientes de AMP, como la proteína quinasa C, responsable de la activación de la transcripción de genes codificantes para proteínas cardiacas como la α -actina^{125,126}. En este sentido, también se ha demostrado que los miocitos presentan canales iónicos en la membrana citoplasmática asociados a proteínas G, susceptibles de ser activados por estímulos mecánicos¹²⁷

4.3.- Mecanismos autocrino-paracrino del miocardio en respuesta a una sobrecarga hemodinámica.

El tejido miocárdico tiene capacidad para producir moléculas con propiedades tróficas en respuesta a una sobrecarga hemodinámica. Hay múltiples evidencias experimentales que muestran una acción autocrina o paracrina de algunos factores de crecimiento y hormonas, liberadas por el propio tejido miocárdico bajo condiciones de elevada presión intraventricular.

4.3.1.- Factores de crecimiento

Es bien conocido que algunos protooncogenes pueden codificar tanto para factores de crecimiento como para sus receptores. La expresión de algunos factores de crecimiento celular, codificados por protooncogenes, se ha visto aumentada en el miocardio bajo condiciones de sobrecarga mecánica¹²⁸. Esto pone de manifiesto el papel que desempeñan algunos protooncogenes como mediadores de crecimiento cardiaco en condiciones de sobrecarga hemodinámica.

4.3.2.- Angiotensina II

En la bibliografía existen múltiples evidencias que apoyan la idea de que la angiotensina II podría actuar como un factor paracrino-autocrino, promoviendo el crecimiento cardíaco.

En este sentido, Dzau y cols, mostraron que la expresión de los genes codificantes para la renina y el angiotensinógeno en el ventrículo izquierdo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) estaban significativamente incrementadas comparada con la de ratas control. También destacó que tanto la actividad del angiotensinógeno como la de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) estaban significativamente incrementadas en el ventrículo izquierdo de corazones hipertróficos de ratas con estenosis aórtica crónica¹²⁹. Otro estudio realizado por Sadoshima y cols, reveló una elevada liberación de angiotensina II en miocitos aislados sometidos a una sobrecarga mecánica¹³⁰. Posteriormente, en otro estudio dirigido por Kojima y cols, se describió que el crecimiento celular de miocitos mediado por factores mecánicos, fue inhibido usando un antagonista del receptor de angiotensina II (TCV-116)¹³¹

4.3.3.- Miotrofina

Otra molécula que se ha descrito como factor autocrino-paracrino es la miotrofina. La miotrofina es un factor soluble localizado principalmente en el miocardio. Desde su descubrimiento, se observó su capacidad para incrementar los niveles de ARNm de genes cuya expresión está alterada cuando se produce un crecimiento exacerbado del ventrículo izquierdo, como la cadena pesada de la β -miosina, α -actina¹³².

4.4.- Mecanismos no hemodinámicos de la hipertrofia del ventrículo izquierdo

También hay múltiples evidencias que apoyan la teoría de que un gran número de estímulos no hemodinámicos juegan un importante papel desencadenante en la aparición de hipertrofia ventricular asociada a hipertensión arterial.

Una serie de estudios sugieren que algunos factores, incluyendo neurotransmisores y hormonas, podrían tener efectos directos en el crecimiento miocárdico en respuesta a la sobrecarga hemodinámica.

4.4.1.- Neurotransmisores

Se ha descrito que el tratamiento con norepinefrina en miocitos aislados y en corazones inducen expresión de proteínas como la cadena pesada de la β -miosina o la α -actina.

4.4.2.-Hormonas

Con respecto a la acción de las hormonas, varios experimentos han mostrado que la fibrosis intersticial del miocardio presente en varios modelos animales de hipertensión están directamente relacionadas con la elevación de la aldosterona en plasma, generado por una entrada excesiva de Na^+ , debido a la sobrecarga hemodinámica^{133,134}. También se ha descrito que la angiotensina II ejerce un efecto de estimulación de la síntesis proteica de la matriz extracelular. La angiotensina II incrementa la síntesis de colágeno en los fibroblastos de manera directamente proporcional a la concentración de angiotensina II. Como es bien sabido, el efecto de la angiotensina II sobre los miocitos y los fibroblastos cardíacos es a través del receptor AT_1 ¹³⁵. Se ha descrito que los niveles de ARNm codificante para angiotensina II y los receptores están incrementados en el ventrículo hipertrófico de ratas hipertensas¹³⁶. Otro de los mecanismos por el que la angiotensina II favorece el incremento de matriz extracelular, es la inhibición de enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular. En este sentido, se ha descrito que la angiotensina II reduce la actividad de la collagenasa (enzima encargada de degradar el colágeno) en cultivo de fibroblastos de rata. Este efecto inhibitorio de la angiotensina II sobre las enzimas de la degradación del colágeno, puede ser anulado con antagonistas del receptor AT_2 , como el PD123177, pero no con antagonistas del receptor AT_1 como el losartán.

5.- SÍNDROME METABÓLICO

Se denomina Síndrome metabólico (SM) o síndrome Plurimetabólico, a la conjunción de varias enfermedades o factores de riesgo en un mismo individuo que aumentan el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus^{137, 138}.

Los factores de riesgo presentes en individuos con SM son principalmente:

- Obesidad abdominal
- Hipertensión arterial
- Resistencia a la insulina
- Hiperglucemia
- Dislipemia

Se ha descrito que el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 para los sujetos con el SM se incrementan de cinco a nueve veces^{139,140}. Como todos los componentes del SM son factores de riesgo cardiovascular, los pacientes afectados con este síndrome tienen cuatro veces más elevado el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular y muerte¹⁴¹.

La frecuente asociación entre hipertensión arterial y diabetes mellitus ha sido ampliamente descrita¹⁴², pero la interrelación con la obesidad u otras situaciones de riesgo, como las alteraciones del metabolismo de la glucosa, hacen pensar que la base de esta asociación epidemiológica podría responder a vínculos fisiopatológicos comunes. La resistencia insulínica, la inflamación o la disfunción endotelial son algunos de los posibles mecanismos.

Existe una estrecha relación entre la obesidad abdominal y los factores de riesgo que definen el SM, especialmente la hipertrigliciremia¹⁴³. Incluso se ha llegado a pensar que el almacenamiento disfuncional de energía del obeso es el punto clave para el desarrollo del SM. La tendencia fisiológica es el almacén de triglicéridos en adipocitos pequeños periféricos, pero cuando la capacidad de estas células se sobrepasa, se acumulan en el músculo y causan resistencia a la insulina de dichos tejidos¹⁴⁴.

El tejido adiposo secreta multitud de hormonas relacionadas con el control de la saciedad y la resistencia a insulina: la adiponectina es inversamente proporcional al grado de insulinoresistencia. La adiponectina es una citoquina antiinflamatoria que se produce de manera exclusiva en los adipocitos. En el hígado inhibe la expresión de enzimas gluconeogénicas y disminuye la producción de glucosa endógena.

La leptina interviene en el control de la saciedad y su defecto produce hiperfagia y obesidad. Los valores de leptina están elevados en los obesos con SM, lo que podría implicar un defecto de su actividad. El resto de mediadores producidos por los adipocitos (TNF- α , IL-6, etc) están en relación con la presencia de un ambiente inflamatorio crónico que contribuye a la disfunción endotelial¹⁴⁵.

6.- EFECTOS DEL SOBREPESO Y LA OBESIDAD SOBRE EL CORAZÓN

Las dietas ricas en carbohidratos y grasas además de producir el evidente aumento de peso corporal y la deposición de grasa visceral favorecen una disminución en la función del ventrículo izquierdo e incluso hipertrofia ventricular¹⁴⁶. Por ello, las guías de nutrición recomiendan dietas con bajo colesterol, pocas grasas saturadas y rica en carbohidratos para prevenir enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular¹⁴⁷. La expresión de proteínas pertenecientes a las principales vías metabólicas celulares están modificadas en la hipertrofia ventricular respecto a corazones no hipertrofiados¹⁴⁸. En este sentido, la expresión de proteínas relacionadas con la oxidación de ácidos grasos y glucosa se han mostrado significativamente reducidas en corazones de ratas hipertrofiadas mientras que la expresión de proteínas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial estaban significativamente aumentada.

Este aumento de peso unido al síndrome de resistencia a la insulina parece estar relacionados con la alteración del metabolismo cardíaco y de las proteínas implicadas en su regulación y correcto funcionamiento¹⁴⁹. Chiu y cols, desarrollaron un modelo de ratones transgénicos que sobreexpresaron acil CoA sintetasa en el corazón. Esta enzima tiene un papel principal en el transporte de los ácidos grasos a través de la membrana plasmática celular. Estos ratones acumularon en los miocitos gran cantidad de triglicéridos, lo cual está relacionado con hipertrofia cardíaca seguida de un desarrollo de disfunción del ventrículo izquierdo y muerte prematura debida a procesos apoptóticos. Esto sugeriría que un desajuste entre el consumo y oxidación en una ruta

metabólica fundamental para el metabolismo cardiaco como es la oxidación de ácidos grasos puede llevar a graves problemas a nivel cardiaco.

La obesidad es un importante predictor del consumo de oxígeno miocárdico y de descenso de la eficiencia cardiaca mientras que la resistencia a la insulina predice de forma eficaz el consumo, utilización y oxidación de ácidos grasos¹⁵⁰. Estos cambios metabólicos ponen de manifiesto una menor eficiencia cardiaca en individuos obesos.

Las consecuencias en el corazón del incremento del peso corporal y del síndrome de resistencia a insulina producida por una dieta rica en grasa (DRG) no han sido del todo investigadas de forma coherente. Por ello, podría ser de interés analizar si la expresión de proteínas asociadas con las principales vías metabólicas, podrían estar afectadas por este tipo de dieta alta en contenido graso y por la resistencia a insulina, lo que podríamos usar como predictor de fallo miocárdico antes incluso de que se produjeran cambios a nivel tanto estructural como funcional.

7.- MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

Los modelos animales de una enfermedad humana se utilizan ampliamente en el diseño de nuevos fármacos, facilitando la comprensión de la fisiopatología de numerosas enfermedades en humanos como es el caso de la hipertensión arterial. Sin embargo, un modelo animal puede presentar diferencias significativas en la fisiopatología o complicaciones de una enfermedad en humanos. Por ello, es evidente que cuanto mayor sea el grado de similitud entre un modelo experimental con una enfermedad humana mayores serán las posibilidades de comprender su fisiopatología.

El uso de ratas SHR es el modelo animal más común hasta la actualidad en estudios experimentales de hipertensión arterial, además este modelo no desarrolla complicaciones vasculares, como aterosclerosis o accidentes cerebrovasculares que pudieran interferir en el objetivo del estudio¹⁵¹.

Por tanto, el modelo animal basado en ratas SHR aporta un magnífico modelo experimental de sobrecarga arterial en el que se presenta una hipertensión con muchas similitudes a la humana, pues se pueden observar las diferentes fases de pre-hipertensión, desarrollo y mantenimiento de la hipertensión, como en el caso de los humanos. Otras de las similitudes de este modelo animal con la patología en humanos

es el desarrollo también en estas ratas de un incremento de la masa cardíaca y la transición a la insuficiencia cardíaca, que en estas ratas ocurre entre los 18 y 24 meses de edad. Por tanto, estas ratas SHR proporcionan un excelente modelo experimental para el estudio de la generación y desarrollo de la hipertrofia cardíaca¹⁵². El estudio mediante la proteómica del corazón de estas ratas nos permitirá conocer las variaciones en la expresión de proteínas asociadas al metabolismo energético de corazones hipertróficos debido a la sobrecarga mecánica soportada por el ventrículo izquierdo del corazón.

8.- MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA RICA EN GRASA

Al igual que sucedía con el modelo experimental animal anteriormente mencionado, el modelo de ratas Wistar Kyoto (WKY) es usado comúnmente debido a su polivalencia desde el punto experimental, con una vida media larga que le hace especialmente útil en estudios de supervivencia.

Los modelos de dietas ricas en grasa en roedores han contribuido a lo largo de los años al estudio de la patofisiología del SM y de sus patologías asociadas¹⁵³. Este tipo de dietas promueven hiperglucemia y resistencia a la insulina a nivel sistémico, debido a ello está ampliamente aceptado que este es un buen modelo para el estudio del SM, resistencia a insulina y funcionalidad de la células beta pancreáticas. En la literatura, diferentes dietas con muy distinta composición en ácidos grasos han sido todas agrupadas bajo la denominación de dietas ricas en grasas con la consecuente variabilidad de resultados debido a ello.

En ratas WKY, una ingesta elevada de aceite de oliva no parece afectar al metabolismo cardíaco mientras que una ingesta elevada de grasa proveniente del coco no parece ser demasiado perjudicial en términos de obesidad ni de resistencia a insulina pero está asociada con esteatosis hepática prominente e hipertrigliceridemia.

Los animales alimentados con dietas altas en grasa a base de aceite de pescado siguen siendo delgados y sensibles a la insulina. Además con dicha dieta las ratas no desarrollan aterosclerosis pero sí aumentan sus niveles de triacilglicéridos y desarrollan resistencia a insulina.

El estudio de este modelo animal nos permitirá analizar las proteínas asociadas a las principales rutas metabólicas energéticas en ventrículos izquierdos antes que sucedan y puedan ser detectadas modificaciones estructurales y/o funcionales del corazón, además de la posible asociación de estos cambios con el síndrome de resistencia a insulina y los niveles circulantes de leptina.

9.- PROTEÓMICA

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función^{154,155}. Las proteínas son partes vitales de los organismos vivos, ya que son los componentes principales de las rutas metabólicas de las células. El término proteómica fue acuñado en 1997 como una analogía con genómica, el estudio de los genes¹⁵⁶.

La proteómica permite realizar el análisis del conjunto de todas las proteínas presentes en una única muestra (célula, tejido, órgano o fluido y en definitiva cualquier muestra que contenga proteínas) en un momento dado, pero no sólo aquellas proteínas procedentes de la expresión génica, sino también de todas aquellas proteínas generadas por las distintas modificaciones post-traduccionales a las que puede verse sometida una proteína.

La descripción del proteoma permite tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente. El estudio y comparación sistemático del proteoma en diferentes situaciones metabólicas y/o patológicas permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estadios fisiológicos. En el caso concreto del análisis proteómico asociado a patologías concretas, es posible identificar proteínas que permitirían diagnosticar la enfermedad o pronosticar la evolución de la misma. Dichas proteínas se conocen con el nombre genérico de biomarcadores¹⁵⁷

La proteómica es una técnica relativamente reciente. Para su despegue definitivo, ha sido necesaria la consolidación definitiva de la espectrometría de masas (MS) como técnica aplicada al análisis de moléculas biológicas y el crecimiento exponencial en el número de entradas correspondientes a genes y/o proteínas en las

bases de datos. Esto, combinado con el empleo de potentes métodos de fraccionamiento y separación de péptidos y proteínas como el 2D-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida de dos dimensiones) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ha permitido consolidar la proteómica, desde mediados de los años 90 del siglo pasado, como ciencia para el análisis masivo de proteínas¹⁵⁸.

Esta técnica ha ido evolucionando a lo largo de los años convirtiéndose poco a poco en una herramienta útil y poderosa para el estudio de múltiples patologías. Fue sufriendo un progresivo auge durante los años 90 coincidiendo con el comienzo de la era de la MS, que como comentaré más adelante es una técnica de apoyo fundamental para el estudio proteómico que ha evolucionado de forma espectacular en los últimos años permitiéndonos poco a poco realizar estudios cada vez más interesantes y exhaustivos.

La proteómica es considerada el siguiente paso en el estudio de un sistema biológico tras la genómica. Es más complicada que la genómica porque mientras que el genoma de un organismo es más o menos constante, el proteoma difiere de una célula a otra y de un momento a otro. Esto se debe a que en los distintos tipos de células se expresan genes distintos, lo que implica que se debe determinar hasta el conjunto básico de proteínas producido en una célula. Un factor adicional de complejidad son las modificaciones que pueden sufrir la estructura o secuencia básica de la proteína, esto es, aquella que aparece codificada en el genoma. Dichas modificaciones provienen básicamente de dos fuentes: el recorte o “splicing” alternativo de los ARNm que codifican para la proteína y las modificaciones postraduccionales (fosforilación, metilación, acetilación, etc) que normalmente sirven para modificar o modular la actividad, función o localización de una proteína en diferentes contextos fisiológicos o metabólicos¹⁵⁹. Ambas fuentes de complejidad incrementan sustancialmente el número de proteínas diferentes que pueden existir: se estima que a partir de los 25 000-30 000 genes que codifican para proteínas en el genoma humano, podrían generarse un número de proteínas diferentes que oscilaría entre 500.000-1.000.000 (Figura 10).

En el pasado, el análisis de los genes que se expresaban en diferentes tipos de células y tejidos y en diferentes contextos fisiológicos era realizado principalmente mediante un análisis de ARNm, pero se encontró que a menudo no existía una

correlación directa entre el contenido en ARNm y el contenido proteico^{160,161}. Se sabe que el ARNm no siempre se traduce a proteína y que la cantidad de proteína producida por una cantidad dada de ARNm depende del estado fisiológico de la célula. Las técnicas proteómicas actuales permiten confirmar la presencia o ausencia de una o más proteínas concretas y determinar su cantidad, bien en valores absolutos o relativos¹⁶²

Las principales áreas de estudio de la proteómica son:

1. Identificación de proteínas y caracterización de sus modificaciones postraduccionales
2. Proteómica de "expresión diferencial"
3. Estudio de las interacciones proteína-proteína

La enorme complejidad (varios miles de proteínas diferentes) del proteoma de la mayor parte de los organismos vivos obliga al empleo de diversas técnicas para separar las proteínas. Entre las técnicas más comunes se encuentran la electroforesis mono y bidimensional.

Así mismo, esta técnica nos permite detectar la existencia de distintas isoformas de una proteína, y analizar las posibles variaciones en su expresión, algo que hasta el momento con el resto de técnicas empleadas para el análisis e identificación de proteínas era prácticamente imposible.

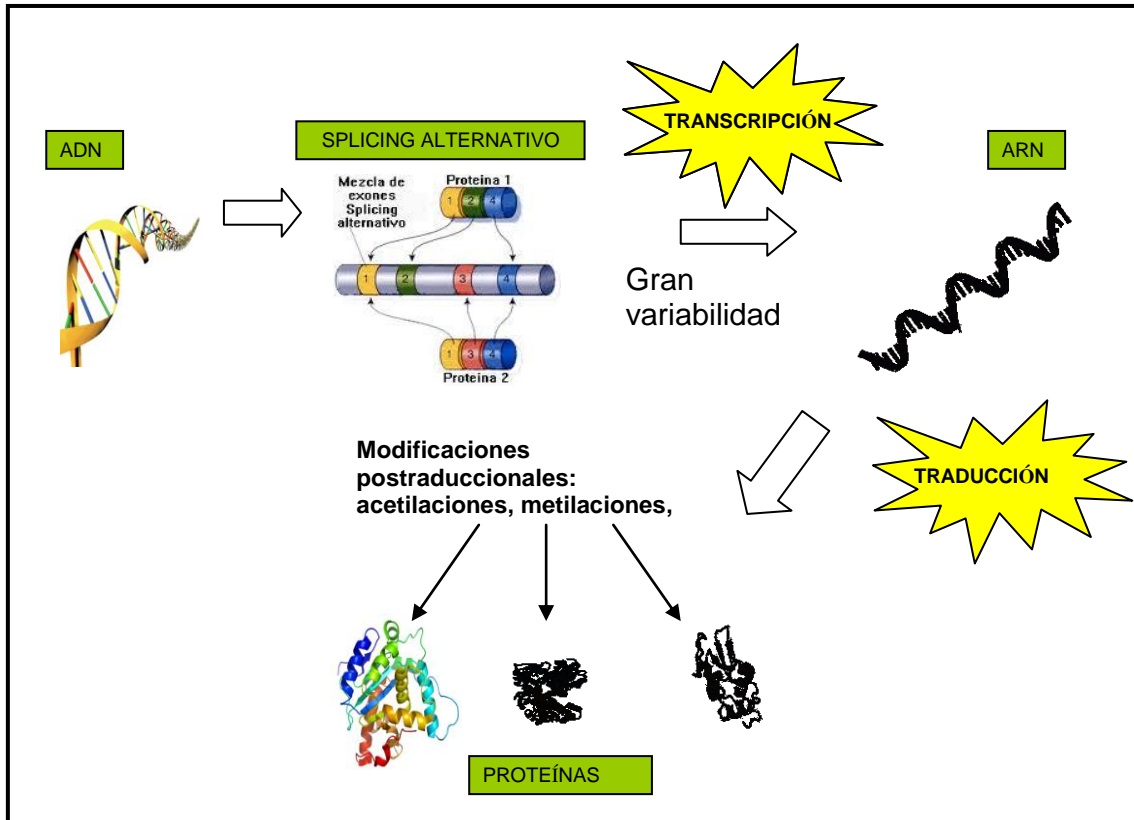


Figura 10. Variabilidad de la expresión proteica.

9.1.- Fundamentos de la técnica

La proteómica básicamente implica la separación, identificación y caracterización de la naturaleza y posición de las modificaciones proteicas. Consiste en la combinación de distintas técnicas: electroforesis bidimensional, análisis de imagen, MS y bioinformática. Además, permite la obtención de información tanto cualitativa como cuantitativa, puesto que nos permite detectar la presencia o ausencia de una determinada proteína(s) en la célula, tejido u órgano que estemos estudiando, así como obtener información sobre variaciones en su expresión ante distintas situaciones como puede ser tras el tratamiento con algún fármaco, o la simple comparación entre la situación normal frente a una patológica.

La electroforesis bidimensional consiste como bien indica su nombre en someter a las proteínas presentes en una muestra a un proceso de doble electroforesis.

Mediante esta técnica se puede analizar cualquier muestra en la que existan proteínas, bien sean extractos celulares, tisulares, órganos o cualquier fluido corporal en el que estén presentes proteínas.

La proteómica va a permitir la separación de las proteínas en dos dimensiones que van a venir definidas por dos de las características más representativas de una proteína, como es el peso molecular (tamaño) y punto isoelectrico (pI) (pH en el cual la carga neta de la proteína es cero). Basándonos en estas dos características únicas y exclusivas de cada proteína vamos a poder definir un mapa de expresión proteico en el que cada proteína va a poder ser identificada según una coordenada de peso molecular y pI.

La primera dimensión se realiza sobre tiras de gel de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado que garantiza la reproducibilidad entre geles. Estos geles se denominan tiras IPG (Isoelectric Phocusing Gradient) y existen en distintos rangos de pH que facilita el estudio puesto que puede ayudar a focalizar y conseguir una mejor resolución en la separación proteica¹⁶³

En la primera dimensión se aplica una corriente eléctrica que permite que las proteínas presentes en el extracto migren a lo largo de la tira IPG y se distribuyan por toda su longitud hasta alcanzar su pI, es decir, el punto donde su carga neta sea cero, y en ese momento se detienen. Así pues, en la primera dimensión las proteínas se separan según carga.

La segunda dimensión se realiza sobre geles SDS-PAGE mediante un proceso de electroforesis normal logrando la separación de las proteínas según su peso molecular.

Esta técnica nos brinda la posibilidad de resolver proteínas que hayan sufrido algún tipo de modificación postraducciona ya que cuando una proteína sufre una modificación postraducciona (fosforilación, glicosilación, etc.) ésta suele conferirle un cambio tanto de carga como de peso molecular, que va a poder ser reflejado en el mapa proteico puesto que la proteína aparecerá en una localización distinta a la normal.

Una vez realizada la segunda dimensión las proteínas presentes en el gel deben ser visualizadas para poder realizar su valoración. Existen distintos tipos de tinción del gel que fundamentalmente se diferencian según la sensibilidad a la hora de detectar proteínas. Destacan la tinción con Azul Coomassie, tinción radiactiva, tinción fluorescente y por último tinción con nitrato plata (Figura 11).

El método de tinción más empleado es hasta el día de hoy, sin duda alguna, la tinción con plata por varios motivos. En primer lugar, es una de las tinciones más sensibles, perdura a lo largo del tiempo, y se obtiene una muy buena calidad de la imagen. Además, este tipo de tinción puede ser compatible con estudios por MS.

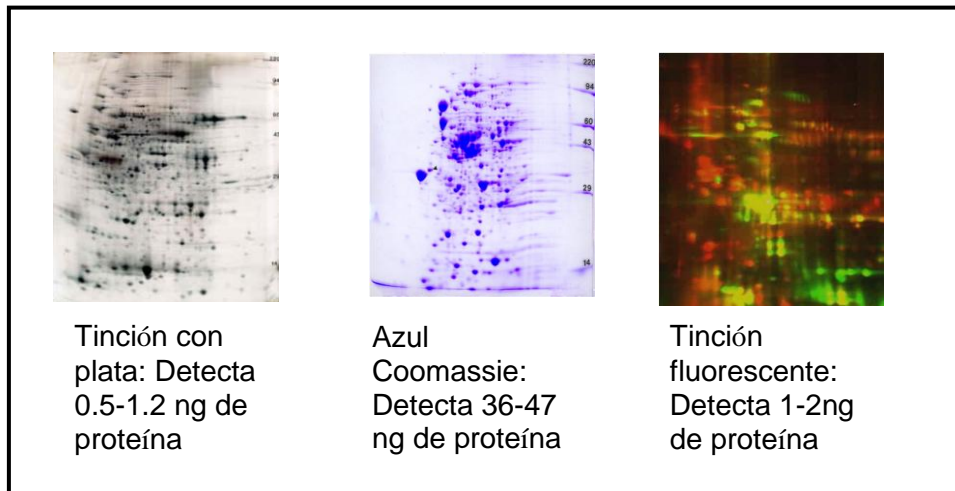


Figura 11.- Diferentes tipos de tinción para geles bidimensionales y sus diferentes sensibilidades a la hora de detectar concentraciones de proteínas.

9.2.- Análisis de Imagen

Una vez obtenido el gel bidimensional o mapa de expresión proteico el siguiente paso es el análisis de la imagen. Hoy en día existen diversas herramientas informáticas (PD-QUEST, MELANIE, etc.) que facilitan mucho el estudio de este tipo de imágenes.

El empleo de este tipo de software va a permitir realizar un completo análisis de los mapas de expresión proteico, permitiendo incluso la comparación entre distintos grupos de mapas proteicos. Además, este tipo de software normalmente permiten la comparación visual con mapas proteómicos existentes en bases de datos disponibles en la red, siendo la base de datos suiza SWISS-PROT (<http://www.expasy.ch>) una de las base de datos más conocida y empleada.

También existen diferentes herramientas informáticas que permiten analizar las variaciones de expresión de las distintas proteínas presentes en los mapas de expresión proteica que permiten la obtención de información cuantitativa de gran utilidad en estudios patológicos. Uno de los programas informáticos que permiten el análisis y comparación de resultados se denomina QUANTITY-ONE (Bio-Rad Laboratories).

9.3.- Espectrometría de Masas

Uno de los desarrollos más importantes en la identificación proteica ha sido la aparición y evolución de las técnicas de MS¹⁶⁴. Desde la década pasada, la sensibilidad y eficacia de los resultados obtenidos por MS ha aumentado en múltiples órdenes de magnitud.

Hoy en día se estima que mediante esta técnica se pueden detectar proteínas en geles bidimensionales en el rango femtomolar. La MS es muy sensible, tolera el análisis de mezclas proteicas y permite la realización de múltiples análisis, por lo que poco a poco ha reemplazado a la secuenciación por el método de EDMAN, convirtiéndose en el método principal de elección.

La MS permite analizar la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos por su relación masa-carga, permite analizar directamente las mezclas proteicas y ofrece un mayor rendimiento por muestra. Por ello, es el método utilizado en las dos técnicas de identificación de proteínas más comunes: la identificación por huella peptídica y el análisis por espectrometría de masas en tandem (MS/MS) (Figura 12).

Los pasos a seguir en un análisis mediante MS son:

- Digestión en gel: Normalmente, la muestra se reduce y alquila. A continuación, se añade una proteasa con una patrón de corte conocido (típicamente, tripsina), generándose una colección o conjunto de péptidos específicos de proteína.

Habitualmente, esta colección de péptidos será lo suficientemente específica como para poder identificar la proteína con la que estamos trabajando.

- Extracción de los péptidos
- Análisis MS MALDI-TOF: este equipo traduce el tiempo de vuelo en masas, pues aunque todos los iones tienen la misma estructura y la misma carga, su peso es distinto.
- Comparación del espectro de masas con la información almacenada en bases de datos de secuencias conocidas, como Swiss-Prot o nr-GenBank. Para ello existen motores de búsqueda como MASCOT que ordenan las proteínas identificadas asignándoles puntos en función del número de coincidencias.

Para evaluar la identificación de la proteína se ha de tener en cuenta su presencia en las bases de datos, maximizar la asignación de fragmentos generados y comprobar si las características de la proteína identificada y la proteína problema coinciden.

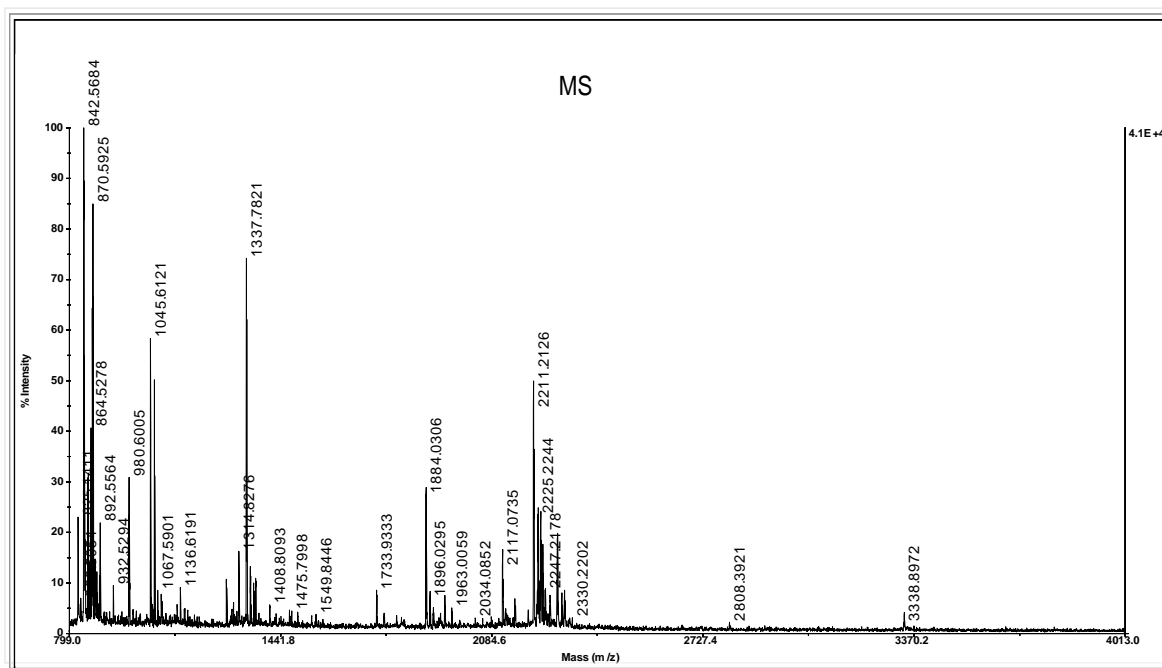


Figura 12. Espectro correspondiente a un análisis proteínico por espectrometría de masas. Cada uno de los picos corresponde a la intensidad de los péptidos resultantes tras la digestión con tripsina.

En definitiva, el objetivo final de cualquier estudio proteómico va más allá de la simple identificación de las proteínas expresadas en un tipo celular en una situación normal frente a una patológica. La proteómica lo que intenta es llegar a comprender mejor los mecanismos metabólicos, vías de señalización y regulación implicadas en la biología celular que puedan ayudar a entender los mecanismos por los que se desarrolla cualquier enfermedad y predecir en cierto modo cómo su función puede variar por la utilización tanto de fármacos como de manipulaciones genéticas etc. Todo esto, en definitiva, permite la identificación de proteínas específicas implicadas en una determinada patología, detección de marcadores de eficacia tras el tratamiento con un determinado fármaco, detección de marcadores de toxicidad así como interpretar mejor los mecanismos de regulación implicados en la biología celular, todo ello en definitiva, para intentar crear un completo mapa tridimensional celular indicando la localización de

cada proteína, los procesos y cambios a los que estas se pueden ver sometidas bajo determinadas circunstancias (translocaciones, procesos de proteólisis, fosforilaciones, uniones entre distintas proteínas.....) que ayuden a comprender mejor los mecanismos moleculares implicados en cualquier proceso metabólico o patológico.

9.4. Antecedentes de la proteómica del corazón en situaciones normales y patológicas

Las causas moleculares subyacentes de la disfunción cardíaca en la mayoría de las enfermedades del corazón siguen siendo en gran parte desconocidas. La proteómica actualmente nos permite estudiar alteraciones globales en la expresión de proteínas en el corazón enfermo y puede proporcionarnos una nueva visión de los mecanismos moleculares implicados en la disfunción cardíaca. Lo que se espera del uso de la proteómica en las enfermedades cardíacas es encontrar nuevos marcadores tanto diagnósticos como terapéuticos.

Las investigaciones con muestras cardíacas humanas son complicadas debido a diferentes factores, como por ejemplo la obtención de la muestra postoperatoria o la obtención de consentimiento informado por parte del paciente. Una opción alternativa es aplicar la proteómica a modelos apropiados de enfermedad humana, los modelos animales son una buena y atractiva alternativa.

Existen diversos modelos de hipertrofia cardíaca, enfermedad cardíaca y fallo cardíaco en pequeños animales, particularmente en rata. Por ejemplo, se han puesto en práctica análisis proteómicos en corazones de ratas focalizados en cambios en la expresión de proteínas cardíacas en respuesta a intoxicación por plomo o alcohol^{165,166}. También se han realizado estudios usando como modelo animal el conejo, en este sentido White y cols. realizaron un estudio proteómico para caracterizar y clasificar en grupos (citoesqueleto, regulación redox, metabolismo energético y estrés oxidativo) cambios globales en la expresión de proteínas cardíacas en respuesta a una lesión isquémica.

Aunque hoy en día son muy pocos los datos proteómicos existentes sobre las patologías de origen cardíaco, es muy probable que en pocos años el conocimiento en este área aumente de forma considerable y permita así la integración de los datos proteómicos y genómicos con los datos funcionales obtenidos previamente de estudios bioquímicos y fisiológicos, permitiendo una mejor comprensión de la enfermedad

cardiaca. Además, el continuo desarrollo tecnológico y la introducción de nuevos abordajes están permitiendo el desarrollo de la proteómica a pasos agigantados.

La proteómica tiene o tendrá el potencial de revolucionar el modo de diagnosticar, determinar el riesgo y el pronóstico clínico así como las estrategias terapéuticas a seguir entre individuos con enfermedad cardiaca. Asimismo, define una base biológica racional para lograr unir directamente la influencia de los factores medioambientales con el producto final de la expresión génica: las proteínas. La proteómica ofrece la posibilidad de comprender en toda su complejidad la función del corazón, brindando la posibilidad de encontrar nuevas vías de actuación para corregir un estado patológico.

HIPÓTESIS

Las alteraciones estructurales y funcionales del corazón asociadas a la hipertensión arterial y a la obesidad parecen estar relacionadas con desajustes del metabolismo energético del corazón producido por un aumento de los requerimientos energéticos. Sin embargo, las alteraciones de las vías metabólicas producidas en dichas circunstancias no son del todo conocidas.

La hipótesis de esta tesis es doble. La primera está en relación con el corazón hipertrófico y la segunda con las alteraciones cardíacas producidas por el consumo de una dieta enriquecida en grasa.

Por otro lado, el análisis proteómico puede ayudar a encontrar nuevos biomarcadores que ayuden a comprender los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la hipertrofia del ventrículo izquierdo y definir mejor las características bioquímicas diferentes del corazón hipertrófico y obeso respecto a un corazón fisiológicamente normal.

MODELO DE RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA

1. La hipertrofia del ventrículo izquierdo se considera un mecanismo adaptativo consecuencia de la hipertensión arterial, y es una de las causas principales de la progresión del corazón hacia la insuficiencia cardíaca. El corazón adulto necesita unos altos requerimientos energéticos para su correcto funcionamiento que estarían más marcados en una situación de hipertrofia cardíaca. Es decir, los trastornos asociados con la hipertrofia cardíaca podrían inducir una serie de mecanismos adaptativos y/o posibilitaran respuestas que desacoplarían las rutas relacionadas con el metabolismo energético del corazón, lo que contribuiría a una mala funcionalidad del miocardio hipertrófico.

MODELO DE RATA ALIMENTADA CON DIETA RICA EN GRASA

2. En situación de sobrepeso y obesidad, la acumulación lipídica en el miocardio parece que aumentaría la β -oxidación y la glucólisis. Sin embargo, es posible que estos cambios metabólicos puedan producirse, antes incluso, de que puedan ser detectados cambios estructurales y/o funcionales en el miocardio.

OBJETIVOS

Los principales objetivos planteados en esta tesis son:

1. Determinar si en el ventrículo izquierdo hipertrófico de ratas espontáneamente hipertensas con respecto al de las ratas control, el nivel de expresión de las proteínas asociadas a las principales rutas relacionadas con el metabolismo energético es diferente.
2. Evaluar la asociación entre los cambios funcionales cardíacos y la expresión de proteínas energéticas en el corazón hipertrófico.
3. Determinar si una dieta rica en grasa puede modificar la expresión de proteínas asociadas con las principales vías metabólicas energéticas en el ventrículo izquierdo antes de que la función cardíaca se vea afectada.
4. Determinar si el aumento del peso corporal podría afectar los requerimientos energéticos del corazón y ser causa de la modificación en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos de esta tesis se han realizado en ratas WKY macho y en ratas SHR. Para la mejor comprensión del diseño experimental de la tesis se explicarán en dos apartados diferentes el diseño experimental de los dos tipos de estudios realizados.

1. ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL CORAZÓN HIPERTRÓFICO DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

El estudio fue realizado en machos de ratas SHR de 24 semanas de edad (n = 11) y sus controles normotensos, ratas WKY (n = 11). Las SHR tienen hipertensión y una fase de hipertrofia establecida a las 18 semanas de edad. Los animales fueron alimentados con una dieta Standard Chow ad libitum (A = 04; PANLAB, Barcelona, España) y tuvieron libre acceso para beber agua. La presión arterial sistólica (PAS) fue medida con un pletismógrafo de cola (Narco Bio-Systems, Houston, TX). En el día del experimento, los animales fueron sacrificados por decapitación y el corazón fue cuidadosamente extraído y pesado. El aislamiento y la manipulación de los corazones se realizaron siempre en condiciones estériles. Los ventrículos izquierdos fueron inmediatamente congelados a -80 ° C. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Cuidados y Usos de Animales de la Universidad Complutense de Madrid, de conformidad con las directrices para el cuidado ético de los animales de experimentación de la Unión Europea.

2. ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL CORAZÓN DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA RICA EN GRASA

El estudio se realizó en ratas macho WKY (n=12; 250 g; Harlan Ibérica SL, Barcelona, España) de acuerdo a las guías éticas de tratamiento a animales de experimentación de la Unión Europea. El protocolo experimental fue aprobado por el comité ético de la Universidad Complutense de Madrid. Los animales se dividieron en dos grupos: ratas alimentadas con una dieta estándar durante 7 semanas que fueron usadas como grupo control (n=6) y ratas alimentadas con una DRG (33.5% de grasa; Harlan Teklad #TD.03307, WI, USA) durante 7 semanas (n=6). El peso corporal fue

medido una vez por semana. La ingesta de agua y comida fue controlada durante todo el periodo experimental utilizando jaulas metabólicas. Los parámetros cardíacos hemodinámicos, metabólicos y moleculares fueron determinados 7 semanas después de que el estudio comenzara.

3. PARÁMETROS HEMODINÁMICOS ARTERIALES Y DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO

En el día del experimento, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina / xilacina (90 y 5 mg / kg, ip) y se les introdujo un transductor de presión (Sciencia FT211B de 1.6F diámetro) a través de la arteria carótida derecha hacia el ventrículo izquierdo, para llevar a cabo las medidas de los parámetros hemodinámicos. Durante este procedimiento se midió la PAS y la presión arterial diastólica (PAD), la presión sistólica máxima del ventrículo izquierdo (PSVI) y la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI). El catéter se conectó a un sistema de adquisición de datos (PowerLab/800. AD Instruments) para su posterior interpretación. Las señales individuales fueron monitorizadas y almacenadas digitalmente para su análisis con el software comercial Chart para Windows (v4.2). Las primeras derivadas del ventrículo izquierdo (+ dP / dtmax y -dP / dtmin) y la frecuencia cardíaca también se determinaron y registraron (Mc Lab 8E, AD Instruments). El mantenimiento de la PAD fue la garantía de que la válvula aórtica no sufrió daños durante el procedimiento. Después de haber registrado la presión arterial y la presión ventricular izquierda, los animales fueron sacrificados por decapitación y los corazones cuidadosamente extraídos. El aislamiento y la manipulación de los corazones se realizaron siempre en condiciones de esterilidad. El peso del corazón fue normalizado con el peso corporal ($\text{mg} \times \text{g}^{-1}$). Esta relación fue utilizada como un índice o un marcador de hipertrofia del corazón.

4. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-DE)

Tras haber realizado el estudio hemodinámico, los ventrículos izquierdos fueron aislados y homogeneizados en una solución tampón (rehydration buffer) que contenía 8 mol/L de urea, 2% CHAPS (3-[3-colamidopropil]dimetilamonio-1-propenosulfonato) w/v, 40 mmol/L de ditiotreititol, 0.2% anfolitos Bio-Lyte

(Laboratorios Bio-Rad, Hercules, California) y 0.01% peso/volumen de azul de bromofenol. Para la primera dimensión, las muestras (250µg proteína total) se cargaron en tiras de geles de gradiente de pH inmovilizado (pH de 3-10), y el foco isoelectrico se realizó con el sistema Protean IEF cell (Laboratorios Bio-Rad). Los geles fueron rehidratados activamente a 50 V durante 60 horas, seguido de pasos de rápidas subidas lineales de tensión y voltaje, limitados por una corriente máxima de 50 µA por gel. En la segunda dimensión, las proteínas de las tiras se separaron según su peso molecular en geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico al 10% utilizando el sistema Protean II XL (Laboratorios Bio-Rad). Posteriormente, los geles fueron fijados y teñidos con plata utilizando el Kit Silver Stain Plus (Laboratorios Bio-Rad), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5. TINCIÓN CON PLATA

Una vez llevada a cabo la segunda dimensión o segundo paso de electroforesis, los geles fueron fijados y teñidos con plata utilizando el Kit Silver Stain Plus (Laboratorios Bio-Rad), los geles se fijaron con una mezcla de etanol y ácido acético en agua destilada durante unos sesenta minutos. Posteriormente se usó una solución de sensibilización compuesta de acetato sódico y tiosulfato sódico en agua destilada. Tras cuatro lavados con agua destilada los geles se sometieron a un proceso de tinción con plata (Silver-Stain Plus Kit, Bio-Rad Labs) durante sesenta minutos. Este último paso de tinción con plata es vital puesto que gracias a él vamos a poder visualizar todas las proteínas presentes en nuestro gel. Es muy importante destacar que la tinción con plata utilizada fue compatible con posteriores pasos de MS, lo cual nos permitió posteriores análisis. El siguiente paso fueron dos lavados con agua destilada de un minuto de duración cada uno para seguidamente aplicar la solución de revelado compuesta de carbonato sódico y formaldehído en agua destilada. Una vez que los geles alcanzaron el grado de tinción deseado se paró el proceso mediante el empleo de una solución con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en agua destilada.

6. ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Los geles teñidos fueron escaneados utilizando un escáner UMAX POWERLOOK III operado por el software Scan Magic V 4.5. El análisis de imágenes

se realizó utilizando los programas PD QUEST 6.2.1 y Quantity One 4.2.3 (Laboratorios Bio-Rad). A la intensidad del volumen de cada punto le fue sustraída la intensidad correspondiente al fondo y el volumen resultante fue normalizado con el valor densitométrico correspondiente a la α -actina cardíaca. Los valores de densitometría de la α -actina cardíaca en los ventrículos izquierdo de WKY y SHR no fueron diferentes (WKY: 1728.15 ± 338.4 , SHR: 982.77 ± 161.6 ; $p = \text{NS}$) al igual que ocurrió en los ventrículos izquierdos de ratas DRG y ratas con dieta standard (DRG: 1900.21 ± 303.94 , Standard: 2402.05 ± 342.5 ; $p=\text{NS}$). La identidad de cada punto se realizó por comparación con el proteoma de corazón de rata publicado por Li y cols¹⁶⁷. Además, la identidad de los puntos estudiados más importantes se confirmaron por MS.

7. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para identificar las proteínas de interés, los puntos se extrajeron manualmente de los geles usando un punzón para biopsias^{168,169}. Para la identificación de cada proteína se extrajo el mismo punto de tres geles diferentes. La tinción de plata fue solubilizada y eliminada, y los puntos fueron lavados tres veces con agua milliQ. Después las muestras se incubaron con acetonitrilo al 100%, se secaron en un SpeedVac y se digirieron toda la noche a 37°C con tripsina (Promega) en 25 mmol/L de bicarbonato amónico (pH 8.5). Después de la digestión, los péptidos se extrajeron del gel mediante una solución 100 mmol/L de bicarbonato amónico. Estos extractos se liofilizaron y resuspendieron en ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 %. Los péptidos se purificaron usando puntas CD-18 (Millipore). Para el análisis de masas, 1 μL de los extractos purificados se mezclaron con 1 μL de matriz de α -ciano 4-hidroxi-transcinámico (Sigma) en acetonitrilo al 50% y 1 μL de esta mezcla se cargó en una placa MALDI y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. La MS se realizó usando un aparato 4700 Proteomic Analyzer (Applied Biosystems) y el análisis se efectuó en modo reflector positivo. Todos los espectros de masas se calibraron usando una mezcla de calibradores standard (Applied Biosystem). El análisis en modo MS produjo la huella peptídica, y algunos de los péptidos observados se analizaron posteriormente en modo MS/MS. Los péptidos con una relación señal-ruido mayor de 20 se consideraron en la Base de Datos Mascot para la identificación de la proteína. Para la identificación proteica, se utilizó la base de datos

Mascot 1.9 (<http://www.matrixscience.com>) como algoritmo para comparar los péptidos obtenidos por MS.

8. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

La expresión de las proteínas triosafosfato isomerasa, fructosa 1,6 bifosfato aldolasa, malato deshidrogenasa, NADH deshidrogenasa y la α -ATP sintasa mitocondrial fueron analizadas por Western blot. Los tejidos homogeneizados se solubilizaron en buffer Laemmli que contiene 2-mercaptoetanol. Las proteínas se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y SDS al 15%. En cada pocillo se cargó la misma cantidad de proteína (20 μ g/pocillo), calculado mediante una reacción colorimétrica basada en la reacción del ácido bicintiónico (Pierce). Las proteínas fueron trasferidas a una membrana de nitrocelulosa (Immobilion-P; Millipore) y las membranas fueron bloqueadas durante toda la noche a 4 ° C, con un 5% (w/v) de leche en polvo no grasa en TBS-T (Tris.buffered saline) [20 mmol / L Tris-HCl (pH 5,2), 137 mmol / L de NaCl y 0,1% de Tween 20]¹⁷⁰. Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas con anticuerpos monoclonales frente a las proteínas de interés (Tabla 2). Después de incubar la membrana con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados de diez minutos cada uno con tampón PBS al 0,5% de Tween. Seguidamente, fueron incubadas con un anticuerpo secundario (Ig G anti-(ratón, conejo o cabra) conjugados con HRP (peroxidasa de rábano). Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia mejorada (ECL®, Amersham Biosciences) y evaluadas por densitometría (Quantity One, Bio-Rad Laboratorios)¹⁷¹. Se utilizaron marcadores de peso molecular (Sigma, St Louis, MI, EE.UU.) para la determinación de la masa molecular.

Con el fin de comparar la expresión proteica de las diferentes proteínas con la expresión de otra proteína constitutiva, se analizó también la expresión de la β -actina. Para ello, se corrió un gel paralelo con las mismas muestras y después de la transferencia a la membrana fue incubada con un anticuerpo monoclonal anti β -actina (1:2000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

La razón de que el análisis sea limitado al estudio de proteínas relacionadas con las principales vías energéticas que el corazón utiliza tanto en situación fisiológica como patológica para la obtención de energía en forma de ATP, es que el objetivo de la

presente tesis es focalizarse en proteínas asociadas con la funcionalidad cardíaca y el metabolismo energético.

Tabla 2. Anticuerpos y sus concentraciones para cuantificar la expresión de las proteínas de interés

Anticuerpo	Concentración	Especie huésped	Casa comercial	Modelo animal
Triosa fosfato isomerasa	1:500	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	Corazón hipertrófico y obeso
Fructosa 1,6 bifosfato aldolasa	1:500	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	Corazón hipertrófico
Malato deshidrogenasa	1:1000	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	Corazón hipertrófico
NADH deshidrogenasa	1:500	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	Corazón hipertrófico
ATP sintasa mitocondrial	1:2000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	Corazón hipertrófico
Carnitina-O-palmitoiltransferasa I	1:1000	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	Corazón obeso

9. DETECCIÓN DE PIRUVATO Y LACTATO

El contenido de piruvato y lactato en ventrículos izquierdos fue cuantificado usando un kit de cuantificación de piruvato (BioVision, USA) y un kit de cuantificación de lactato (BioVision, USA). Para este propósito, 80 µg de cada homogeneizado de ventrículo izquierdo fue usado para calcular la concentración en ambos ensayos siguiendo las instrucciones del fabricante.

10. PARÁMETROS METABÓLICOS

Al finalizar el estudio, las concentraciones plasmáticas de colesterol, glucosa, insulina (R&D Systems, MN, USA) y leptina (DRG GmbH instrument, Germany) fueron medidas usando un ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay) cuantitativo específico de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La sensibilidad a insulina periférica fue evaluada basada en la evaluación del modelo de homeostasis (HOMA).

Los niveles de glucosa se valorarán mediante la reacción de la glucosa oxidasa (R&D System, MN USA). Los niveles de insulina se midieron mediante un

inmunoensayo enzimático comercial (R&D System, MN USA). Se calcula el grado de resistencia a la insulina mediante el índice HOMA según la siguiente fórmula:

$$\text{Glucosa plasmática (mmol/L)} \times \text{insulina plasmática (mU/L)} / 22.5^{172}$$

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la significación estadística entre las diferentes proteínas estudiadas entre ratas WKY y ratas SHR, se utilizó la prueba de Mann-Whitney con el programa SPSS versión 12.0 (SPSS Inc.). Un valor $P < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo. Los resultados están expresados como media \pm error estándar de la media (E.E.M.).

Para determinar las diferencias estadísticas entre ratas DRG y ratas alimentadas con una dieta standard se usó el test estadístico de Mann-Whitney. La correlación de Pearson fue usada para determinar las asociaciones entre los niveles de expresión de proteínas en el proteoma de ventrículo izquierdo de ratas y el índice HOMA, peso corporal de la rata, nivel de insulina, nivel de leptina, nivel de glucosa y nivel de colesterol total plasmático. Las determinaciones estadísticas se realizaron usando el programa informático SPSS 12.0 program (SPSS Inc.). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los resultados están expresados como la media \pm EEM.

RESULTADOS

RESULTADOS

Para una mejor comprensión de los resultados primero se analizaran aquellos pertenecientes al estudio del ventrículo hipertrófico y posteriormente al ventrículo de animales alimentados con DRG.

1.- ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL MODELO DE CORAZÓN HIPERTRÓFICO DE RATAS HIPERTENSAS

1.1.-Peso del corazón y parámetros hemodinámicos

Tras 24 semanas de vida, las ratas SHR presentaban un incremento significativo de los valores de presión sistólica y diastólica cuando fueron comparados con los valores del grupo control (Tabla 3). Sin embargo, la frecuencia cardiaca fue similar en ambos grupos. No se encontraron diferencias en el peso corporal entre animales hipertensos y normotensos. Sí hubo diferencias significativas en el peso de los corazones. En las ratas SHR el peso del corazón fue mayor que el del grupo normotenso, sugiriendo la presencia de una hipertrofia cardíaca en las ratas SHR. Tanto la PDFVI como la PSVI fueron significativas mayores en SHR que en los controles. Estos cambios en las SHR se asociaron con un incremento del $+dP/dt$ pero no del $-dP/dt$.

Tabla 3. Parámetros hemodinámicos del corazón. * $p < 0.05$ con respecto al ventrículo izquierdo de ratas Wistar Kyoto (WKY).

	WKY	SHR	P
PAS	117 ± 5.89	$133 \pm 7.49^*$	0.0001
PAD	80 ± 4.69	$95 \pm 5.95^*$	0.0001
FC	237 ± 3.77	231 ± 7.42	0.4607
PRC	0.28 ± 0.003	$0.35 \pm 0.009^*$	0.0001
PSVI	122 ± 3.41	$135 \pm 3.83^*$	0.0227
PDFVI	3.5 ± 0.165	$5 \pm 0.294^*$	0.0003
$+dP/dt_{\max}$	6807 ± 116.08	$8875 \pm 370.36^*$	0.0001
$-dP/dt_{\min}$	-5582 ± 181.8	-5894 ± 135.1	0.1639

1.2.-Análisis de proteínas en el ventrículo izquierdo cardiaco de ratas WKY y SHR

Se han detectado más de 248 puntos en los geles bidimensionales del ventrículo izquierdo de ratas normotensas (Figura 10). Estos puntos se encontraban en un rango de peso molecular de 15-200 kDa y con un pI entre 3-10. En el proteoma del ventrículo izquierdo de las ratas SHR se detectaron alrededor de 340 puntos. Los resultados reflejan un aumento significativo del número de proteínas en el ventrículo izquierdo hipertrófico de ratas SHR (Figura 13).

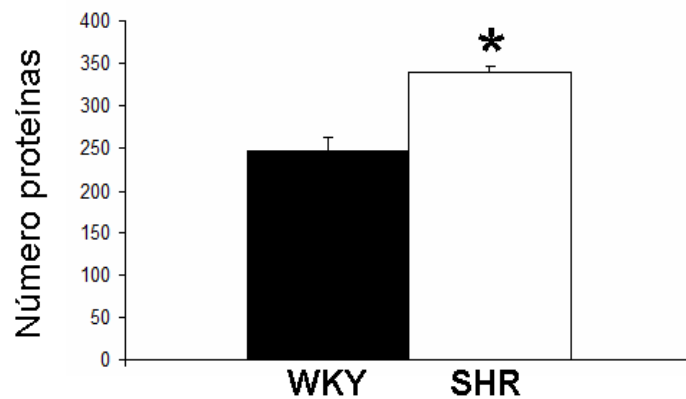


Figura 13. Número de proteínas presentes en el proteoma de ventrículo izquierdo de ratas WKY y SHR. Análisis densitométrico del Western blot. Los resultados están representados como media \pm E.E.M. por cada grupo experimental. * $P < 0.05$ con respecto al grupo control.

En esta tesis nos focalizamos en identificar y cuantificar la expresión de diferentes proteínas asociadas al metabolismo energético del corazón en el ventrículo izquierdo analizando el proteoma de dicho tejido (Figura 14).

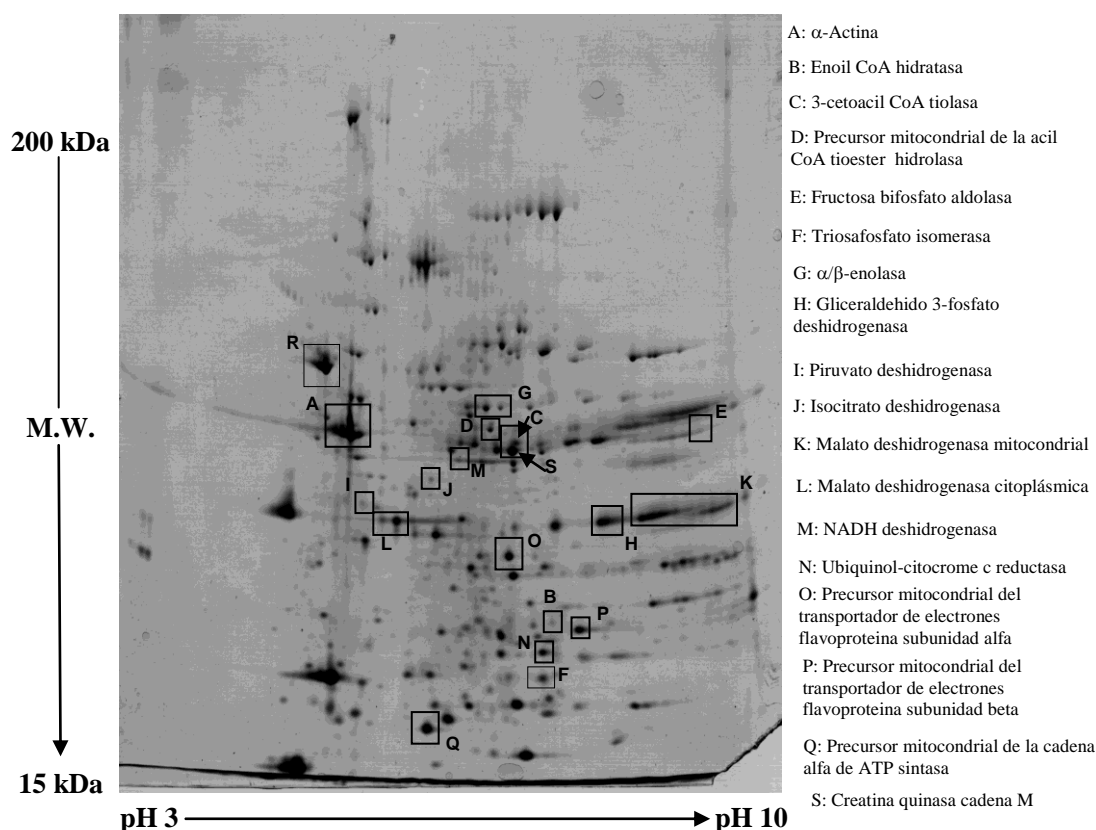


Figura 14. Gel bidimensional (2-DE) representativo de ventrículo izquierdo de SHR usando un rango de pH de 3 a 10. Las áreas analizadas en cada grupo experimental fueron de la B a la S. El área A correspondiente a la proteína α -actina se usó para normalizar el volumen y el valor densitométrico del resto de las áreas estudiadas.

En la mayoría de los casos, la identificación de los diferentes puntos encontrados en el proteoma de corazón de rata, se realizó usando como modelo el proteoma publicado por Li y cols¹⁶⁷. Cuando se observaron diferencias significativas entre los diferentes puntos entre el ventrículo izquierdo de ratas SHR y normotensas se confirmó la identificación proteica mediante MS. En la tabla 4 se muestra el método utilizado para identificar las diferentes proteínas del ventrículo de rata. En el caso de que esta identificación se realizará mediante MS o MS/MS se muestra la secuencia cubierta y los péptidos cubiertos.

Resultados

Tabla 4. Métodos seguidos para identificar las proteínas presentes en el ventrículo izquierdo de rata después de correr la electroforesis bidimensional (2-DE)

PROTEINA	MASA TEÓRICA (kDa / pI)	MASA EXPERIMENTAL (kDa / pI)	BASE DE DATOS Número de acceso	PÉPTIDOS CUBIERTOS	MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN	SECUENCIA CUBIERTA
Alfa actina	42.3/5.23	42.3/5.23	P68035	10 CDDEETTALVCDNGSG LVK/AGFAGDDAPR/AV FPSIVGRP/VAPEEHPTL LTEAPLNPK/TTGIVLDS GDGVTHNVPIYEGYALP HAIMR/GYSFVTTAER/S YELPDGQVTTIGNER/D LYANNVLSGGTTMYPG IADR/QEYEDEAGPSIVH R	MS	39%
Enoil-CoA hidratasa	28.2/8.1	27.9/8.00	P14604	-	Mapa cardíaco	-
3-cetoacil-CoA tiolasa	42.2/8.09	42.9/7.26	P13437	2 VGVPPTETGALTLNR/YA LQSQQR	MS/MS	5%
Precursor mitocondrial de acil CoA tioester hidrolasa	49.9/7.68	42.8/7.01	O55171	1 GLAPEQPVTLR	MS/MS	2%
Fructosa bifosfato aldolasa	39.3/9.0	43.1/9.20	P05065	-	Mapa cardíaco	-
Triosa fosfato isomerasa	27.3/6.51	24.7/7.81	P48500	7 LPADTEVVCAPPTAYID FAR/DLGATWVVLGHSE R/HIFGESDELIGQK/VVF EQTK/TATPQQACEVHE K/CNVSEGVAQCTRIIYG GSVTGATCK	MS+MS/MS	37%
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	35.9/8.44	33.4/8.65	P04797	5 VGVNGFGR/LVINGKPIT IFQE/LTGMAFR/VTPN VSVVDLTC/LISWYDNE YGYSN	MS	17%
α/β -enolasa isoforma 1	47.1/7.74	45.2/6.99	P04764	5 AAVPSGASTGIYEALEL R/KLSWDQEK/VVIGMD VAASEFYR/TGAPCRSE R/IEEALGDKAVFAGR	MS+MS/MS	14%
α/β -enolasa isoforma 2	47.1/7.74	45.4/7.06	P04764	3 AAVPSGASTGIYEALEL R/VVIGMDVAASEFYR/ LAQSNWGWVMVSHR	MS+MS/MS	10%
Piruvato deshidrogenasa	38.8/5.9	34.1/5.80	50925725	6 LEEGPPVTTVLTR/LPCI FICENNRYGMGTsver/ RGDFIPGLRVDGMDILC UR/FAAAYCR/GPILMEL QTYRYHGHSMSPGVs YRTREEIQEV/MVNSNL ASVEELKEIDYEUR	MS	28%-
Isocitrato deshidrogenasa	39.6/6.5	37.1/6.72	16758446	-	Jin X y cols	-
Malato deshidrogenasa mitocondrial isoforma 1	36.1/8.9	33.7/8.80	P04636	7 GYLGPEQLPDCLK/CDVVV IPAGVPK/IFGVTTLDIVR/TI IPLISQCTPK/AGAGSATLS MAYA/VFSLVDAMNGK/ET ECTYFSTPLLL	MS	27%

Resultados

PROTEINA	MASA TEÓRICA (kDa / pI)	MASA EXPERIMENTAL (kDa / pI)	BASE DE DATOS Número de acceso	PÉPTIDOS CUBIERTOS	MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN	SECUENCIA CUBIERTA
Malato deshidrogenasa mitocondrial isoforma 2	33.8/9.2	33.8/9.20	P04636	6 GYLGPEQLPDCLKGCD VVVIPAGVPR/IFGVTTL DIVR/TIPLISQCTPK/AG AGSATLSMAYAGARFV F/SLVDAMNGK/ETECT YFSTPLLLGK	MS	27%
Malato deshidrogenasa citoplasmática isoforma 1	36.5/6.16	33.5/5.89	P14152	4 SQGTALEK/ENFSCSLTR/ GEFITTQQR/FVEGLPI NDFSR	MS+MS/MS	11%
Malato deshidrogenasa citoplasmática isoforma 2	36.5/6.16	33.3/6.15	P14152	2 GEFITTQQR/FVEGLPI NDFSR	MS/MS	6%
Ubiquinol citocromo C reductasa	29.7/9.04	26.2/7.79	P20788	1 VPDFEDYR	MS/MS	2%
NADH deshidrogenasa	31.9/5.4	39.3/6.85	46391108	-	Jin X y cols	-
Subunidad α del precursor mitocondrial flavoproteína	35.2/8.67	31.2/7.10	P13803	6 VLVAQHDAYK/SPDTFV R/GTSFEAAAASGGS/AP SSSSAGBEWLDQK/SDR PELTGAK/AADAGFVPN DMQVGQTGK	MS	24%
Subunidad β del precursor mitocondrial flavoproteína	27.5/8.57	27.5/8.57	Q9DCW4	4 HSMNPFCELAVEEAVR/ TALAMGADR/EIDGGLE TLRLKLPAVVTADLR/V SVSVEEPPQR	MS+MS/MS	23%
Precursor mitocondrial de la cadena α de la ATP sintasa	22.2/6.2	22.2/6.7	P15999	8 LSVRVAAAVAR/ILGAD TSVDLEETGGR/EAYPG DVFYLRH/GIDRPAINV GLSVSR/VGSAAQTR/LE LAQYR/GYLDKLEPSK/E IVTNFLAGFEA	MS+MS/MS	16%
Precursor mitocondrial de la cadena β de la ATP sintasa	50.7/4.9	50.7/4.9	A28701	16 LVLEVAQHLGESTVR/TI AMDGTEGLVR/VLDSG APIKIPVGPETLGR/IMN VIGEPIDER/VVDLAPYA K/IGLFGGAGVKG/AHG GYSVFAGVGER/EGNDL YHEMBGVINLK/VALVY GQMNEPPGAR/VALTGL TVAEYFR/FTQAGSEVS ALLGR/PSAVGYQPTLA TDMGMTQER/AIAELGI YPAVDPPLDSTSR/IMDP NTVGSEHYDVAR/ILQD YK/ADKLAEHGS	MS	47%
Creatina quinasa cadena M	43.2/6.58	41.3/7.26	P00564	4 VLTPDLYNKLR/DLFDPI QDR/FEEILTR/GTGGVD TAAVGAVFDYSNADR	MS	12%

MS: Espectrometría de masas; MS: análisis MALDI-TOF; M: <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/RAT-HEART/2d/>; MS/MS: Espectrometría masas en tandem. MALDI-TOF MS= matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Jin X y cols, Referencia bibliográfica con los que se compararon los puntos de los geles bidimensionales.

A continuación, se presentarán los resultados de la expresión proteica de las enzimas identificadas en el ventrículo izquierdo de ratas WKY y SHR, agrupadas según la vía metabólica energética en las que participen.

1.2.1.-Proteínas asociadas a la β -oxidación

En este estudio se han identificado tres proteínas implicadas en la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga:

1. Enoil-CoA hidratasa.
2. 3-cetoacil CoA tiolasa.
3. Precursor mitocondrial de acil-CoA tioester hidrolasa.

Como puede verse en la tabla 5, tanto la expresión proteica de las enzimas, 3-cetoacil CoA tiolasa como del precursor mitocondrial de acil-CoA tioester hidrolasa estaban significativamente aumentadas en el ventrículo izquierdo de ratas SHR comparado con la expresión en el ventrículo izquierdo de ratas WKY. Sin embargo, en el caso de la enoil-CoA hidratasa ocurría lo contrario, su expresión en el ventrículo hipertrófico de las SHR estaba disminuida de forma significativa, respecto a la expresión de esta enzima en el caso de las ratas WKY.

Tabla 5. Análisis densitométrico de la expresión en unidades arbitrarias de las proteínas asociadas a la β -oxidación en el ventrículo izquierdo.

Proteína	WKY	SHR	p
Enoil-CoA hidratasa	9.17 \pm 2.4	0.90 \pm 0.3*	0.012
3-cetoacil-CoA tiolasa	1.51 \pm 0.4	4.58 \pm 1.7*	0.033
Precursor mitocondrial	1.41 \pm 0.4	6.42 \pm 1.3*	0.0009
Acil CoA tioester hidrolasa			

Los resultados densitométricos están expresados como la media \pm EEM. * $p < 0.05$ con respecto al ventrículo izquierdo de ratas Wistar Kyoto (WKY).

1.2.2.-Proteínas asociadas a la glucólisis

Cuatro enzimas citosólicas implicadas en la glucólisis se identificaron en el proteoma del ventrículo izquierdo:

1. Fructosa bifosfato aldolasa
2. Triosa fosfato isomerasa
3. Dos isoformas de la enzima α/β -enolasa
4. Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

La proteínas fructosa bifosfato aldolasa y triosa fosfato isomerasa mostraron una expresión significativamente reducida en los ventrículos izquierdos de las ratas SHR con respecto los niveles medidos en el grupo WKY. Contrariamente, la expresión de las dos isoformas de la α/β -enolasa estaban significativamente incrementadas en el grupo SHR, mientras que la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa no mostró diferencias en su expresión proteica entre ambos grupos de estudio. (Tabla 6)

Tabla 6. Análisis densitométrico de la expresión en unidades arbitrarias de las proteínas asociadas a la oxidación de la glucosa en el ventrículo izquierdo

Proteína	WKY	SHR	p
Fructosa bifosfato aldolasa	2.76 \pm 0.7	0.80 \pm 0.4*	0.011
Triosa fosfato isomerasa	7.78 \pm 1.2	4.54 \pm 1.3*	0.05
Gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa	30.04 \pm 5.3	30.66 \pm 8.4	0.999
α/β -enolasa isoforma 1	3.63 \pm 0.6	8.36 \pm 1.5*	0.012
α/β -enolasa isoforma 2	2.04 \pm 0.7	4.48 \pm 1.1*	0.025

Los resultados densitométricos están expresados como la media \pm E.E.M. * $p < 0.05$ con respecto al ventrículo izquierdo de ratas Wistar Kyoto (WKY).

Los cambios en la expresión proteica de la triosa fosfato isomerasa y de la fructosa bifosfato aldolasa también fueron analizadas mediante la técnica de Western

blot (Figura 15). La expresión proteica de ambas proteínas se encuentra significativamente disminuida en el ventrículo izquierdo de ratas SHR.

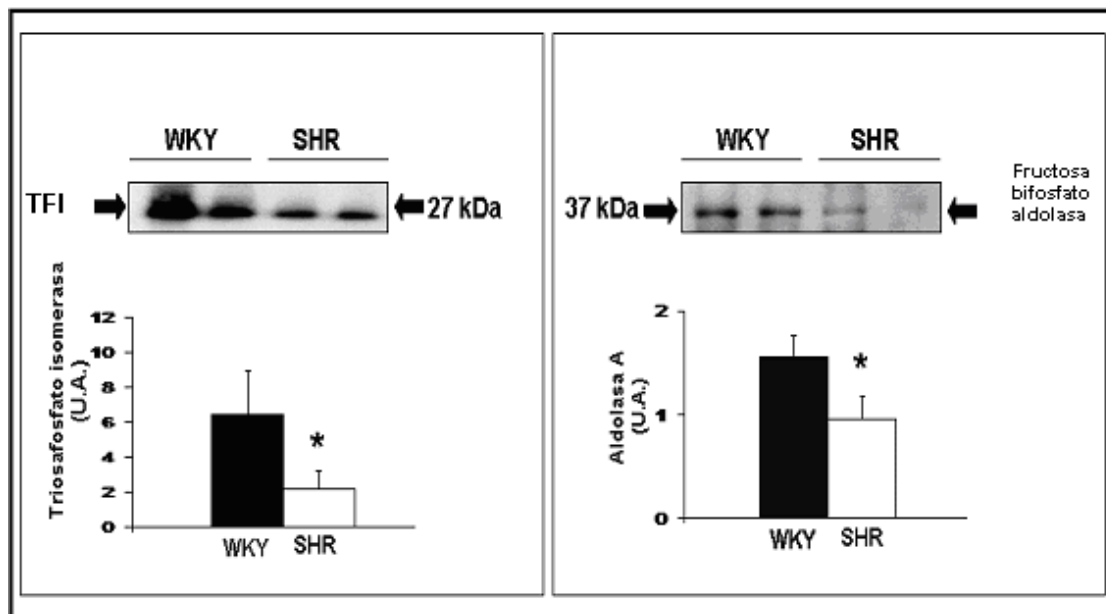


Figura 15. En la parte superior se muestra un Western blot de la expresión de las enzimas triosafostato isomerasa (TFI) y Fructosa bifosfato aldolasa en el ventrículo izquierdo de ratas Wistar Kyoto (WKY) y SHR. La parte inferior muestra un gráfico de barras representando el análisis densitométrico de los Western blots. Los resultados están representados como media \pm E.E.M. U.A.: unidades arbitrarias.

* $P < 0.05$ respecto a las ratas WKY (grupo control).

1.2.3.-Proteínas asociadas al ciclo de Krebs

Con respecto a las enzimas implicadas en el ciclo de Krebs, dos de ellas han sido identificadas en el presente estudio:

1. Isocitrato deshidrogenasa.
2. Cuatro isoformas de la enzima Malato deshidrogenasa.

Ninguna de las isoformas de estas enzimas sufrió cambios significativos en su expresión en el ventrículo izquierdo. En ambos grupos de estudio se presentaron niveles de expresión parejos, por lo que se sugiere que el ciclo de Krebs, el principal ciclo metabólico energético en el corazón, no sufre variaciones significativas.

Otra de las enzimas de vital importancia en el metabolismo energético del corazón es la enzima PDH, esta enzima transforma uno de los productos de la glucólisis, el piruvato, en el metabolito que da comienzo el ciclo de Krebs, el acetil-CoA. La PDH fue identificada en el proteoma del ventrículo izquierdo, observándose un incremento de la expresión proteica en el grupo de las SHR comparada con las ratas normotensas (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis densitométrico de la expresión en unidades arbitrarias de la piruvato deshidrogenasa y de las proteínas asociadas al ciclo del ácido tricarboxílico en el ventrículo izquierdo de ratas.

Proteína	WKY	SHR	p
Isocitrato deshidrogenasa	1.20 ± 0.2	2.33 ± 0.7	0.395
Malato deshidrogenasa mitocondrial isoforma 1	19.72 ± 4.4	19.35 ± 3.9	1
Malato deshidrogenasa mitocondrial isoforma 2	15.08 ± 3.2	15.02 ± 5.8	0.656
Malato deshidrogenasa citoplasmática isoforma 1	5.37 ± 1.3	5.10 ± 1.1	0.882
Malato deshidrogenasa citoplasmática isoforma 2	6.73 ± 1.4	10.72 ± 2.6	0.201
Piruvato deshidrogenasa	2.01 ± 0.2	4.40 ± 0.8*	0.009

Los resultados densitométricos están expresados como la media ± E.E.M. * p<0.05 con respecto al ventrículo izquierdo de ratas Wistar Kyoto (WKY).

Para corroborar estos datos, se analizó la expresión total de cada proteína mediante la técnica de Western blot. Como se puede apreciar en la figura 16, no se altera la expresión de ninguna de las dos enzimas cuando se comparan los dos grupos experimentales mediante Western blot. Estos datos apoyan nuevamente la inexistencia de alteraciones en el ciclo de Krebs en el ventrículo hipertrófico de las ratas SHR.

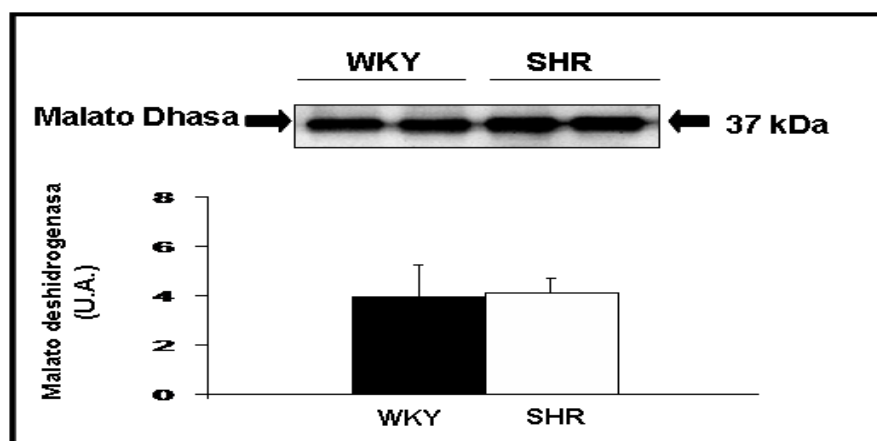


Figura 16. En la parte superior se muestra un Western blot representativo de la expresión de la enzima malato deshidrogenasa en el ventrículo izquierdo de ratas Wistar Kyoto (WKY) y SHR. La parte inferior muestra un gráfico de barras representando el análisis densitométrico del Western blot. Los resultados están representados como media \pm E.E.M. U.A.: unidades arbitrarias.

1.2.3.1-Contenido de piruvato

Se determinó la cantidad de piruvato contenido en el ventrículo izquierdo. El piruvato como se ha señalado dicho anteriormente, es el sustrato de la enzima piruvato deshidrogenasa. Como se observa en la figura 17, la expresión de esta enzima está aumentada en el grupo de las ratas SHR, por lo que cabría esperarse un aumento del piruvato en condiciones de hipertensión e hipertrofia.

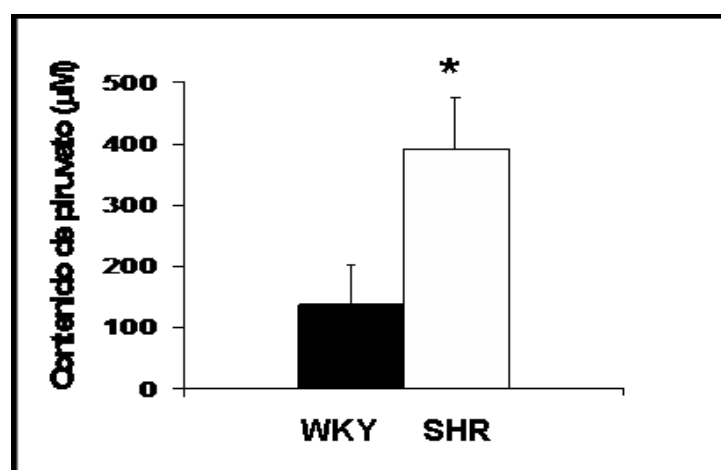


Figura 17. Contenido de piruvato en el ventrículo izquierdo de ratas WKY y SHR. Los resultados se presentan como la media \pm E.E.M. *P < 0.05 respecto a las ratas Wistar Kyoto (WKY).

En este sentido, los resultados de la figura 17, muestran un incremento significativo del contenido de piruvato en los corazones hipertróficos de las ratas SHR comparado con el ventrículo izquierdo de los corazones de las ratas normotensas.

1.2.4-Proteínas asociadas a la fosforilación oxidativa mitocondrial

Se identificaron cuatro proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa mitocondrial:

1. NADH deshidrogenasa
2. Ubiquinol,citocromo C reductasa
3. Precursor mitocondrial de las subunidades α - y β -flavoproteínas.
4. Precursor mitocondrial de las subunidades α - y β - ATP sintasa

La expresión proteica de ubiquinol-citocromo C reductasa y NADH deshidrogenasa estaban significativamente incrementadas en los ventrículos izquierdos hipertróficos de las ratas hipertensas en comparación con la de las ratas normotensas (Tabla 8). Sin embargo, las subunidades α - y β - del precursor mitocondrial de la flavoproteína no registraron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales estudiados (Tabla 8). Con respecto al precursor mitocondrial de la ATP sintasa, el análisis densitométrico mostró un aumento significativo de la expresión de la subunidad β de la enzima. Sin embargo, la subunidad α del precursor de la ATP sintasa resultó estar significativamente disminuida los ventrículos hipertróficos (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis densitométrico de la expresión en unidades arbitrarias de las proteínas asociadas a la fosforilación oxidativa mitocondrial en el ventrículo izquierdo de ratas.

Proteína	WKY	SHR	p
Ubiquinol-citocromo C reductasa	5.35 \pm 0.6	11.15 \pm 2.5*	0.01
NADH deshidrogenasa	2.95 \pm 0.7	6.22 \pm 1.4*	0.033
Precursor mitocondrial del transportador de electrones flavoproteína subunidad α	9.36 \pm 1.3	9.10 \pm 0.9	0.882
Precursor mitocondrial del transportador de electrones flavoproteína subunidad β	3.85 \pm 0.8	2.84 \pm 0.5	0.436
Precursor mitochondrial de ATP sintasa cadena α	32.38 \pm 4.9	19.17 \pm 4.2*	0.031
Precursor mitochondrial de ATP sintasa cadena β	43.89 \pm 5.2	83.15 \pm 14.1*	0.001

Los resultados densitométricos están expresados como la media \pm E.E.M. * $p < 0.05$ con respecto al ventrículo izquierdo de ratas Wistar Kyoto (WKY).

Para verificar los resultados de expresión obtenidos por el análisis densitométrico de los geles bidimensionales de los ventrículos izquierdo de rata, se realizaron Western blot de la NADH deshidrogenasa y la subunidad α de la ATP sintasa (Figura 18).

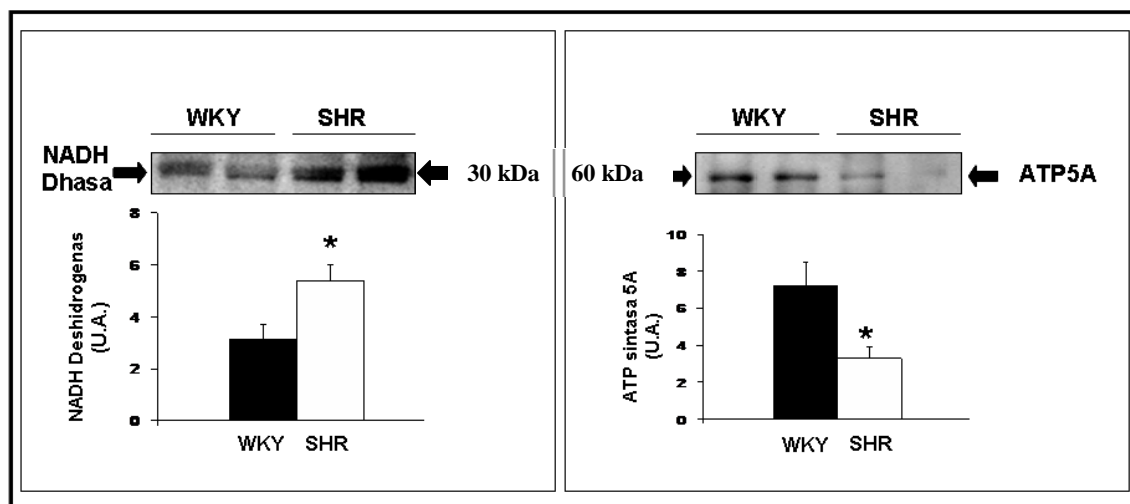


Figura 18. En la parte superior se muestra un Western blot de la expresión de las enzimas NADH deshidrogenasa y ATP sintasa 5A en el ventrículo izquierdo de ratas Wistar Kyoto (WKY) y SHR. La parte inferior muestra un gráfico de barras representando el análisis densitométrico de los Western blots. Los resultados están representados como media \pm E.E.M. U.A.: unidades arbitrarias. * $P < 0.05$ respecto a las ratas WKY (grupo control).

Como puede observarse en la figura 18, la expresión de la NADH deshidrogenasa estaba aumentada en el grupo de las ratas SHR, como previamente se había descrito por proteómica. Con respecto a la proteína a la subunidad alfa de la ATP sintasa, se corroboró la disminución de su expresión en los ventrículos izquierdos de ratas SHR.

1.2.5-Proteína Creatina Quinasa

Se identificó una proteína que es esencial para la producción de energía en forma de ATP, ya que cataliza la reacción de adición de un fosfato inorgánico a creatina. Este fosfato inorgánico luego se cederá para formar una molécula de ATP. La expresión de creatina quinasa estaba significativamente aumentada en ventrículo izquierdo del grupo de ratas SHR con respecto a las ratas normotensas. (Figura 19)

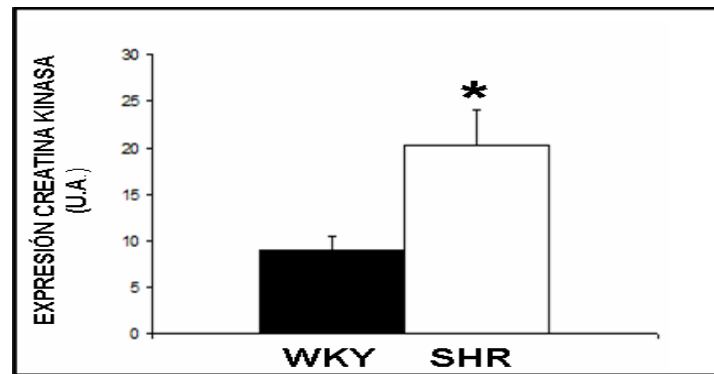


Figura 19. El gráfico de barras muestra la expresión de la creatin kinasa en el ventrículo izquierdo de ratas Wistar Kyoto (WKY) y SHR. Los resultados están representados como media \pm E.E.M. U.A.: unidades arbitrarias.

2-. ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL MODELO DE CORAZÓN DE RATAS CON SOBREPESO

Tras la alimentación durante 7 semanas con la DRG, estas ratas mostraron un mayor peso corporal que las ratas control alimentadas con una dieta estándar también durante 7 semanas. La tabla 9 muestra la composición de ambas dietas. Los niveles plasmáticos de glucosa, colesterol total, insulina y leptina estaban más elevados de forma significativa en ratas DRG que en ratas control (Tabla 10). El índice HOMA también resultó ser más alto en ratas DRG comparadas con las ratas control (Tabla 10).

Table 9. Composición de la dieta standard y la dieta rica en grasa

	Dieta standard (g/kg)	Dieta rica en grasa (g/kg)
Proteína cruda	143.0	233.5
Carbohidratos	480.0	347.5
Grasa	40.0	350.0
Minerales y vitaminas	29.1	69.0

El contenido de la dieta rica en grasa era de (%de grasa total): 40% saturada, 50% monoinsaturada, 10% poliinsaturada. Dieta standard Kcal/g=2.9; Dieta rica en grasa Kcal/g=5.4

Tras siete semanas, las ratas DRG no mostraron ningún cambio en el peso relativo del corazón, PSVI, PDFVI, +dP/dt ni en -dP/dt con respecto a las ratas control (Tabla 10). Además la presión sistólica también fue similar entre ambos grupos de estudio (Tabla 10). A continuación se analizaron las proteínas de los ventrículos izquierdos de las ratas alimentadas con dieta DRG y dieta standard. Para cada rata de ambos grupos de estudio se realizó electroforesis bidimensional del ventrículo izquierdo. Las proteínas del ventrículo izquierdo fueron identificadas todas por MS y MS/MS pudiéndose obtener con ello los péptidos cubiertos y su número de acceso a la base de datos Mascot (Tabla 4).

Tabla 10. Parámetros bioquímicos y hemodinámicos cardiacos de ratas control y ratas alimentadas con una dieta rica en grasa.

Parámetros	Control N=6	DRG N=6
Hemodinámicos cardiacos		
PAS (mmHg)	158.8±13.9	158.6±9.4
FC (lpm)	394.6±29.6	379.6±15.3
PRC (g/ 100 g pc)	0.3±0.01	0.2±0.01
PSVI (mmHg)	130.6±16.3	146.0±7.7
PDFVI (mmHg)	3.6±0.3	3.7±0.5
+dP/dt _{max} (mmHg/s)	9145.2±333.8	8262.3±187.7
-dP/dt _{min} (mmHg/s)	-6710.2±622.5	-7321.3±161.4
Bioquímicos		
Peso corporal (g)	411.0±13.4	557.3±7.7*
Glucosa (mg/dl)	88.4±4.0	107.0±2.2*
Colesterol total (mg/dl)	48.1±0.03	59.4±2.4*
Insulina (µg/dl)	0.6±0.1	1.0±0.05*
Índice HOMA	3.1±0.3	6.5±0.3*
Leptina (pg/ml)	7597.5±1245.0	27795±5502.1*

Abreviaturas: Los resultados están expresados como la media ± EEM *p<0.05 con respecto a las ratas control.

2.1.-Proteínas asociadas con la β -oxidación y glucolisis

Tal y como muestra la Tabla 11, la expresión de 3-cetoacil-CoA tiolasa, el precursor mitocondrial de la acil-CoA-hidrolasa y enoil-CoA hidratasa, todas ellas enzimas implicadas en la β -oxidación de ácidos grasos, estaban significativamente aumentadas en los ventrículos izquierdos de ratas DRG con respecto a las ratas control (Tabla 11).

Tabla 11. Proteínas implicadas en la oxidación de ácidos grasos y glucolisis

	Proteína	CONTROL	DRG	P
<i>Proteínas implicadas en la β-oxidación de ácidos grasos</i>	<i>3-ceto-acil-CoA tiolasa</i>	0.87 \pm 0.29	2.43 \pm 0.43*	0.016
	<i>Precursor mitocondrial de acil-CoA tioester hidrolasa</i>	1.92 \pm 0.89	6.96 \pm 0.24*	0.009
	<i>Enoil-CoA hidratasa</i>	5.15 \pm 1.14	22.11 \pm 5.44*	0.034
<i>Proteínas implicadas en la glucolisis</i>	<i>Triosa fosfato isomerasa</i>	2.96 \pm 1.14	13.51 \pm 3.84*	0.027
	<i>Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa</i>	4.96 \pm 0.54	5.67 \pm 1.77	0.999
	<i>α/β-enolasa</i>			
	<i>Isoforma 1</i>	1.15 \pm 0.48	9.37 \pm 2.26*	0.006
	<i>Isoforma 2</i>	1.8 \pm 0.45	7.70 \pm 1.03*	0.006
	<i>Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa</i>	19.63 \pm 3.04	49.76 \pm 6.65*	0.006

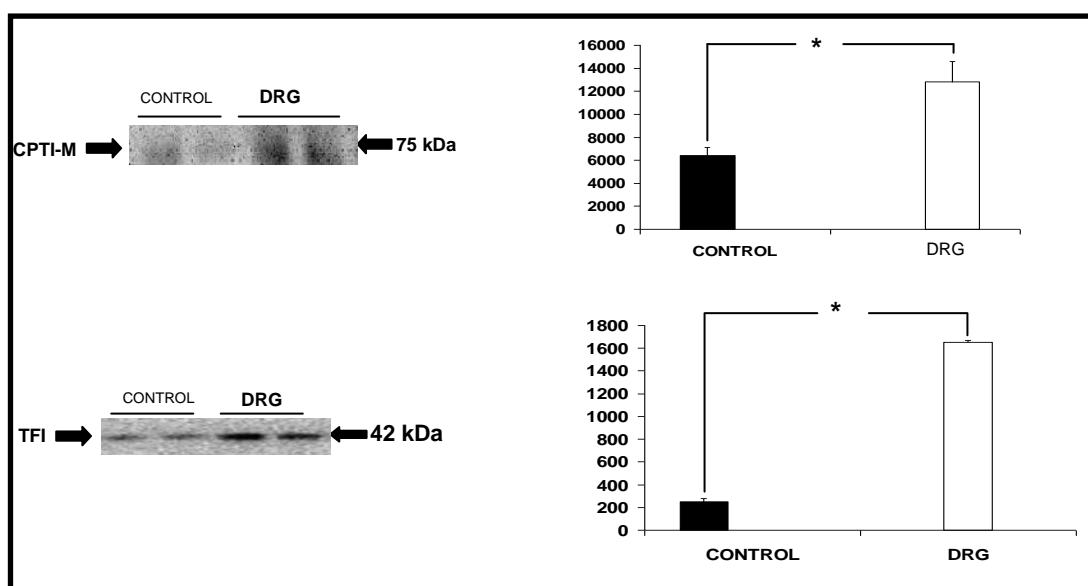
Los resultados están expresados como la media \pm EEM. Un valor de $p < 0.05$ es considerado estadísticamente significativo.

Además, la expresión de la enzima CPTI fue determinada mediante Western blot. Esta enzima facilita el transporte de ácidos grasos al interior mitocondrial y cataliza la reacción de unión de carnitina a ácidos grasos para su posterior entrada a la mitocondria a través de unos transportadores o translocadores mitocondriales. Por tanto, esta enzima es fundamental para la iniciación de la oxidación de los ácidos grasos.

Luego en los experimentos de Western blot se observó un aumento significativo de su expresión en los ventrículos izquierdos de ratas DRG con respecto a los ventrículos de las ratas control (Figura 20). La expresión de la triosafosfato

isomerasa, enzima clave glicolítica también fue determinadas por Western blot. Tal y como la Figura 20 muestra estando aumentada significativamente en los ventrículos izquierdos de ratas DRG.

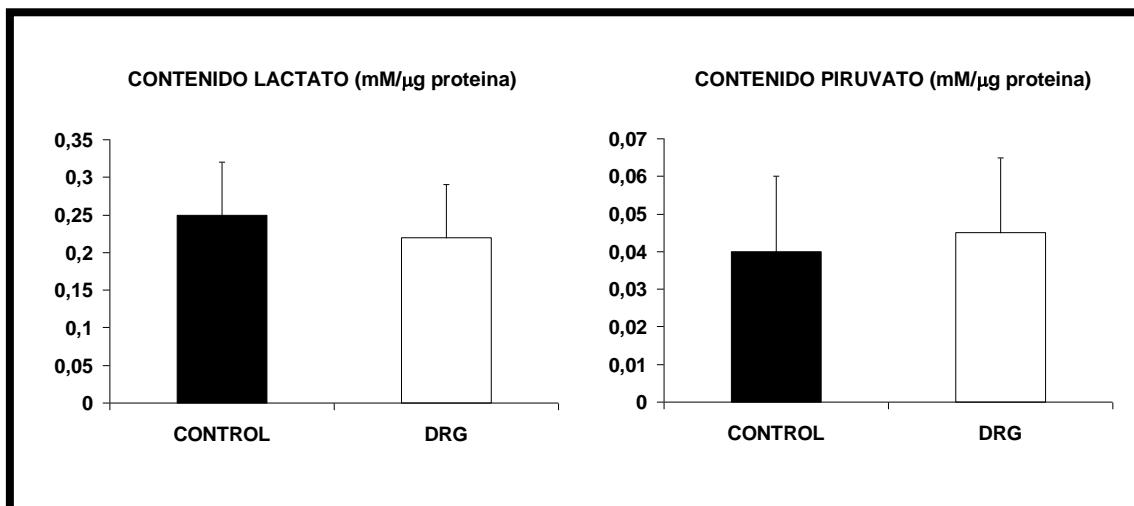
Figura 20. Western blot representativo de la expresión en ventrículo izquierdo de carnit (CPTI) y triosa fosfato isomerasa en ratas DRG y ratas control.



Dos isoformas de α/β -enolasa identificadas en el mapa proteómico de ventrículo izquierdo estaban significativamente sobreexpresadas en ratas DRG comparadas con los ventrículos de las ratas control (Tabla 11). La expresión de la gliceraldehido-3-fosfato isomerasa estaba también incrementada en los ventrículos izquierdos de ratas DRG (Tabla 11).

También se midió el contenido de piruvato y lactato en ventrículos izquierdos. En las ratas DRG, el contenido en el ventrículo izquierdo de lactato y piruvato fue similar al observado en los ventrículos izquierdos de las ratas control (Figura 21). Sin embargo, la expresión de PDH determinada mediante electroforesis bidimensional estaba incrementada en los ventrículos izquierdos de las ratas DRG con respecto a los controles (Tabla 12).

Figura 21. Contenido de lactato y piruvato en el ventrículo izquierdo de ratas DRG y ratas control. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0.05$ con respecto a controles.



2.2-Proteínas asociadas con el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa mitocondrial

La expresión proteica de la isocitrato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa mitocondrial, ambas enzimas pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, fue significativamente mayor en ventrículos izquierdos de ratas DRG que en ratas control (Tabla 12).

Además, se analizaron proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa mitocondrial. Como muestra la Tabla 12, el nivel de expresión de varias proteínas implicadas en esta cadena como por ejemplo, NADH deshidrogenasa, subunidades α y β del precursor mitocondrial de la flavoproteína y la ubiquinol citocromo C reductasa, fue superior en ventrículos izquierdos de ratas DRG al compararlo con las ratas control. La expresión de la subunidad beta de la ATP sintasa no fue diferente entre los ventrículos izquierdos de ambos grupos en estudio (Tabla 12). El nivel de expresión de la cadena M de la creatina quinasa fue significativamente mayor en ventrículos izquierdos del grupo de ratas DRG (Tabla 12).

2.3-Asociación entre los cambios en la expresión de proteínas metabólicas en el ventrículo izquierdo, biomarcadores funcionales y parámetros circulatorios

El análisis de Pearson mostró que el peso corporal de las ratas estaba positivamente asociado con el nivel de expresión de las siguientes proteínas, que habían mostrado diferencias entre ambos grupos de estudio en ventrículos: precursor mitocondrial de la acil-CoA-tioester hidrolasa, α/β enolasa isoformas 1 y 2, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, NADH deshidrogenasa, subunidad α del precursor mitocondrial de la flavoproteína, ubiquinol-citocrome C reductasa (Tabla 13).

No se encontraron evidencias que relacionaran el nivel de expresión de ninguna de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético, en las cuales se habían visto diferencias en su expresión entre ratas DRG y ratas control con los niveles circulantes de glucosa, insulina o el índice HOMA (Tabla 13). Los niveles plasmáticos de colesterol total fueron los únicos que tuvieron una asociación positiva con la expresión en el ventrículo izquierdo del precursor mitocondrial de la subunidad beta de la flavoproteína (Tabla 13). También fue observada una correlación positiva entre los niveles circulantes de leptina con el precursor mitocondrial de la subunidad α de la flavoproteína y con el precursor mitocondrial de la acil-CoA tioester hidrolasa (Tabla 13).

Tabla 12. Proteínas implicadas en el ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa.

	Proteína	CONTROL	DRG	P
<i>Proteínas implicadas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos</i>	<i>Piruvato deshidrogenasa</i>	2.94±0.74	8.77±0.75*	0.006
	<i>Malato deshidrogenasa mitocondrial</i>	16.85±2.92	28.56±2.95*	0.037
	<i>Isocitrato deshidrogenasa</i>	2.5±0.27	10.80±0.82*	0.009
<i>Proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa mitocondrial</i>	<i>NADH deshidrogenasa</i>	2.17±0.54	7.86±1.00*	0.006
	<i>Precursor mitocondrial de la subunidad α de la flavoproteína</i>	5.65±1.63	28.18±3.85*	0.006
	<i>Precursor mitocondrial de la subunidad β de la flavoproteína</i>	3.39±0.86	22.19±2.63*	0.025
	<i>Ubiquinol-citocromo C reductasa</i>	3.15±0.93	18.36±2.70*	0.014
	<i>Precursor mitocondrial de la subunidad β de la ATP sintasa</i>	76.18±27.07	64.82±8.96	0.522
	<i>Cadena M de la creatina quinasa</i>	4.39±0.95	15.42±1.64*	0.006

Resultados

Tabla 13. Correlación de Pearson de las proteínas significativamente diferentes en los ventrículos izquierdos de ratas DRG y ratas control respecto al peso corporal, glucosa, insulina, índice HOMA, colesterol total y niveles de leptina.

Proteína	Peso corporal		Niveles circulantes glucosa		Niveles circulantes insulina		Índice HOMA		Niveles plasmáticos de colesterol total		Niveles circulantes leptina	
	Coefficiente Pearson	P	Coefficiente Pearson	P	Coefficiente Pearson	P	Coefficiente Pearson	P	Coefficiente Pearson	P	Coefficiente Pearson	P
3-CETOACIL-CoA TIOLASA	0.506	0.054	0.005	0.988	0.108	0.714	0.133	0.650	0.077	0.794	0.475	0.086
MITOCONDRIAL ACIL-CoA TIOESTER HIDROLASA	0.653	0.008*	0.114	0.699	0.294	0.308	0.343	0.230	0.520	0.057	0.543	0.045*
ENOIL-CoA HIDRATASA	0.331	0.293	-0.095	0.781	-0.185	0.586	-0.175	0.606	0.528	0.095	0.038	0.912
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA	0.431	0.124	0.190	0.534	-0.091	0.767	0.036	0.907	0.147	0.632	0.178	0.561
$\alpha\beta$ -ENOLASA isoforma 1	0.520	0.032*	0.197	0.465	0.000	0.999	0.097	0.721	0.287	0.282	0.206	0.443
$\alpha\beta$ -ENOLASA isoforma 2	0.606	0.010*	0.185	0.492	0.238	0.375	0.298	0.262	0.317	0.232	0.449	0.081
GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA ISOCITRATO DESHIDROGENASA MALATO	0.597	0.015*	-0.161	0.566	0.194	0.488	0.151	0.592	0.264	0.341	0.377	0.166
DESHIDROGENASA MITOCONDRIAL PIRUVATO	0.648	0.007*	0.405	0.134	0.090	0.749	0.267	0.336	0.091	0.748	0.491	0.063
DESHIDROGENASA NADH	0.374	0.139	-0.059	0.828	0.203	0.450	0.200	0.457	0.086	0.752	0.053	0.847
DESHIDROGENASA PRECURSOR MITOCONDRIALDE LA SUBUNIDAD α -DE LA FLAVOPROTEINA	0.485	0.057	-0.114	0.687	0.043	0.880	0.030	0.915	0.182	0.516	0.163	0.561
PRECURSOR MITOCONDRIALDE LA SUBUNIDAD β DE LA FLAVOPROTEINA	0.622	0.008*	0.015	0.957	-0.037	0.892	0.025	0.927	0.170	0.529	0.294	0.269
UBIQUINOL-CITOCROMO C REDUCTASA CADENA M	0.616	0.008*	0.202	0.454	0.060	0.825	0.162	0.550	0.180	0.506	0.521	0.038*
CREATINA QUINASA	0.379	0.201	0.265	0.381	0.282	0.631	0.062	0.499	0.737	0.004*	0.289	0.339
	0.657	0.011*	-0.037	0.904	-0.111	0.350	0.268	0.375	0.366	0.219	0.537	0.058
	0.461	0.072	0.144	0.609	0.135	0.718	0.190	0.840	-0.149	0.597	0.317	0.249

Valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Para una mejor comprensión de la discusión de los resultados de esta tesis se ha dividido la discusión en dos grandes bloques. En el primer bloque se discutirán los resultados relativos a las ratas SHR y en el segundo a las del modelo de ratas alimentadas con dieta alta en grasa.

1.- MODELO DE CORAZÓN HIPERTRÓFICO DE RATAS HIPERTENSAS

Los resultados de esta tesis muestran cambios en la expresión de proteínas implicadas en diferentes rutas metabólicas en el ventrículo izquierdo de ratas SHR. Este es el primer estudio que utilizando la técnica de la proteómica se ha centrado en el análisis de forma integrada de las proteínas implicadas en las principales vías relacionadas con el metabolismo energético en el ventrículo hipertrófico de ratas SHR. Existen dos estudios previos de proteómica, en los cuales las proteínas asociadas al metabolismo energético del ventrículo izquierdo habían sido parcialmente analizadas. El primero de estos estudios fue diseñado utilizándose un número demasiado bajo de ratas ($n=3$)¹⁷³. En el segundo, estudio dirigido Zhou y cols, el número de proteínas e isoformas pertenecientes a las principales vías metabólicas analizadas fueron mucho menores que el que se presenta en esta tesis. Estas limitaciones pueden plantear conclusiones confusas¹⁷⁴.

.

1.1 Cardiopatía hipertrófica y hemodinámica

El desarrollo de la hipertrofia hipertensiva del ventrículo izquierdo ocurre como respuesta adaptativa a la sobrecarga de presión arterial¹⁷⁵. El estudio de esta patología usando ratas SHR es muy común en la comunidad científica, ya que estas ratas aportan un modelo animal de hipertensión inducida genéticamente, en el que se desarrolla fracaso cardiaco con la edad, de forma muy similar a como ocurre en el hombre¹⁷⁶.

En el modelo SHR utilizado en este trabajo de tesis, las ratas desarrollaron hipertrofia cardiaca. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros estudios previos, en los que se ha demostrado la existencia de hipertrofia cardiaca en ratas SHR adultas¹⁷⁷. La hipertrofia cardiaca de ratas SHR se acompañó de una elevación de la

PSVI y $+dP/dt$, que ocurrió probablemente como mecanismo adaptativo compensatorio a una elevada presión. Estos resultados están en concordancia con medidas hemodinámicas previas realizadas por otros grupos en los que también se ha demostrado una mayor función sistólica en el corazón de las ratas SHR^{178,179}. También en concordancia con otros estudios previos, nuestros resultados demostraron una elevación de PDFVI, lo que indica la existencia de disfunción diastólica, que es un efecto muy común en corazones hipertróficos de ratas SHR¹⁷⁹. La disfunción diastólica ocurre cuando la cámara ventricular no está en condiciones de aceptar un volumen de sangre durante la diástole, que permita mantener un volumen sistólico apropiado^{181,182}. Estas anomalías están causadas por la disminución de la relajación ventricular y/o un aumento de la rigidez ventricular.

Se ha propuesto que la hipertrofia cardiaca provoca un desajuste en el balance del metabolismo energético del corazón. En este sentido, numerosas publicaciones han mostrado un desajuste en el equilibrio del metabolismo energético cardiaco. Un número elevado de estudios han mostrado un desplazamiento de la utilización de la β -oxidación de los ácidos grasos hacia la utilización de la glucosa como el principal sustrato energético del corazón hipertrófico²³. Así, Iemitsu y cols, mostraron que los niveles de ARNm codificantes para enzimas claves en la oxidación de la glucosa estaban significativamente aumentados en los corazones hipertróficos de ratas SHR¹⁸³. Como se discutirá en los siguientes puntos, esta tesis muestra cambios moderados en las principales vías metabólicas energéticas del corazón como la oxidación de ácidos grasos, glucolisis y ciclo de Krebs, sugiriendo que en estas condiciones de disfunción diastólica no existe un desplazamiento hacia la vía metabólica glicolítica como alternativa a la oxidación de ácidos grasos. Además, los resultados de esta tesis muestran como novedad una importante adaptación de la fosforilación oxidativa mitocondrial para satisfacer la elevada y constante demanda de ATP, probablemente reflejados en los incrementos de PSVI y $+dP/dt$

1.2 Proteínas asociadas a la β -oxidación de los ácidos grasos

La β -oxidación de los ácidos grasos, convierte los ácidos grasos de cadena larga en moléculas de acetil CoA. Esta vía metabólica es la principal vía de aporte energético en corazones no hipertróficos¹⁸⁴. El proceso consiste en una serie de reacciones que permiten la separación de dos carbonos de la molécula original en forma de acetil CoA

después de que el carbono β se oxide a grupo ceto. El grupo acil CoA resultante, con dos carbonos menos que el grupo acil CoA original, reinicia otra vuelta de la β -oxidación, al cabo de la cual perderá también dos carbonos que aparecerán como una segunda molécula de acetil CoA, y así sucesivamente hasta que el grupo acil CoA original haya sido catabolizado completamente a moléculas de acetil CoA. Así, la mayor parte de la energía del ácido graso original se encuentra contenida en la acetil CoA producto de la β -oxidación, debiendo ser catabolizada a través del ciclo de Krebs para que finalmente su energía sea captada como ATP.

Estudios recientes han sugerido la utilidad del desplazamiento del ácido graso a la glucosa como principal metabolito energético en corazones hipertróficos²³. El corazón hipertrófico tiene un incremento del metabolismo glucídico debido a la aceleración de la glucolisis, capta mayor cantidad de glucosa por lo que tal alteración parece deberse a una modificación de la regulación del proceso glucolítico. Además, está disminuida la enzima encargada de la transferencia de los ácidos grasos hacia la mitocondria. Por lo tanto, la reducción de la provisión citoplasmática y mitocondrial de los ácidos grasos sería responsable de la alteración del metabolismo de estos sustratos en el corazón hipertrófico. El aumento del metabolismo glucolítico incrementa la captación de glucosa independiente de la insulina, que a su vez se activa ante el trastorno energético del miocardio. Se aumenta la translocación de transportadores para glucosa y estimula la glucolisis a través de la fosforilación y activación de la enzima FFQ. Estos hallazgos son compatibles con la observación de que en el corazón hipertrófico, tanto el aumento de la glucolisis como el de la captación de glucosa son independientes de la insulina. La inhibición de la transferencia de ácidos grasos a través de la vía de la carnitina disminuye la oxidación de este sustrato e incrementa la metabolización de la glucosa.

En este sentido, de las Fuentes y cols, han descrito deficiencias en la oxidación de ácidos grasos de cadena larga en el miocardio del ventrículo izquierdo de ratas hipertensas mediante tomografía de positrones. Esta disminución de la oxidación de ácidos grasos fue asociada a una reducción de la eficiencia miocárdica¹⁸⁵. En esta tesis, se ha analizado la expresión de tres proteínas implicadas en la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga: enoil-CoA hidratasa, 3-cetoacil CoA tiolasa y el precursor de la acil-CoA tioester hidrolasa.

La expresión de la enoil-CoA hidratasa, que cataliza la formación del 3-hidroxiacil-CoA en la segunda reacción del ciclo de la oxidación de ácidos grasos, estaba disminuida en el ventrículo izquierdo de las ratas SHR. Sin embargo, la expresión proteica de 3-cetoacil CoA tiolasa, enzima que promueve la reacción de la β -ketoacil-CoA para formar acetil CoA, estaba aumentada en el grupo SHR.

Numerosos investigadores han descrito una reducción de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga asociada con bajos niveles de carnitina miocárdica en corazones hipertróficos¹⁵². La carnitina es una molécula absolutamente necesaria para el transporte desde la membrana mitocondrial hacia el interior mitocondrial donde ocurre la β -oxidación¹⁸⁶. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la disminución en la β -oxidación de ácidos de cadena larga en el corazón hipertrófico podría ser no solo consecuencia de una reducción de carnitina miocárdica sino también de la disminución de la expresión de una de las enzimas clave implicada en la oxidación de los ácidos grasos, como la enoil-CoA hidratasa. De acuerdo a estos resultados, Sack y cols, describió una disminución significativa de los niveles de los ARNm codificantes para las enzimas que catalizan el primer paso (acil-CoA deshidrogenasa) y el tercer paso (β -hidroxiacil CoA deshidrogenasa) de la β -oxidación en ratas hipertróficas²⁸

Por lo tanto, la β -oxidación de los ácidos grasos podría verse comprometida por la disminución de la expresión de la enzima enoil-CoA hidratasa, observada en el corazón hipertrófico de ratas SHR. Este decremento enzimático podría generar una excesiva acumulación de metabolitos derivados de los ácidos grasos (resultantes de reacciones previas a la de la enzima enoil-CoA hidratasa) en corazones hipertróficos, que podría causar una inhibición por “*retroalimentación*” de la β -oxidación de los ácidos grasos¹⁸⁷. Como respuesta compensatoria y para tratar de reducir tales metabolitos de los ácidos grasos, podría ocurrir la sobreexpresión de las enzimas 3-cetoacil CoA tiolasa y precursor de la acil-CoA tioester hidrolasa observada en los resultados de esta tesis. En este sentido, en un estudio dirigido por Gerber se ha descrito que la actividad hidrolítica de la enzima acil-CoA tioester hidrolasa, por la que se hidroliza o rompe el ácido graso acil-CoA a ácidos grasos libres y CoA-SH, se ha asociado a la reducción de la acumulación de los ácidos grasos libres en mitocondria cardiaca en ratas diabéticas¹⁸⁸.

1.3 Proteínas asociadas a la glucolisis

Como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis, en el corazón hipertrófico se ha descrito que, debido a la disminución de la oxidación de los ácidos grasos, se produce un aumento del consumo de otros sustratos energéticos, principalmente la glucosa¹⁸⁹. Esto se fundamenta en el hecho de que algunos trabajos han sugerido que mediante la glucolisis estaría incrementado el metabolismo de la glucosa en corazones hipertróficos^{190,191}. Sin embargo, en los resultados se ha mostrado que la expresión proteica de dos enzimas claves en la vía metabólica de la glucolisis, la fructosa 1,6 bi-fosfato aldolasa y la triosafosfato isomerasa, estaban significativamente reducidas en el ventrículo del corazón hipertrófico comparado con corazones sanos. Este dato fue confirmado en el caso de la enzima fructosa 1,6 bi-fosfato aldolasa por la técnica del Western blot (técnica basada en la especificidad anticuerpo-antígeno), que volvió a mostrar una reducción significativa en la expresión de esta enzima.

En el proteoma del ventrículo izquierdo cardiaco, también se identificó y cuantificó la enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa y dos isoformas de la α/β -enolasa. El análisis densitométrico de estas enzimas no revelaron alteración en la expresión de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa, sin embargo mostraron un aumento en la expresión de las dos isoformas de α/β -enolasa en el ventrículo izquierdo de las ratas SHR.

La enzima α/β -enolasa cataliza la reacción de conversión del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. El aumento en la expresión de estas dos isoformas de α/β -enolasa en el corazón de las ratas SHR podría ser explicado, de forma semejante a lo que ocurre con la enoíl CoA hidratasa en la β -oxidación, como a un mecanismo cardiaco compensatorio que trata de aumentar la degradación de la glucosa. En este sentido, Zhou y cols, también describieron un aumento de la expresión de la α/β -enolasa en corazones hipertróficos¹⁷⁴.

Ya que en el estudio de Zhou y cols solo se había determinado la expresión de la α/β -enolasa como enzima representante de la glucolisis en corazones hipertróficos, se asumió que la glucolisis estaba estimulada en el ventrículo izquierdo en situaciones de hipertrofia ventricular¹⁷⁴. Sin embargo, los resultados obtenidos, revelan una disminución de la expresión de proteínas fundamentales para los primeros pasos de la glucolisis, los ya mencionados en la fructosa 1,6 bi-fosfato aldolasa o la triosafosfato

isomerasa, no apoyan la idea de una estimulación de la glucolisis en corazones hipertróficos. Además, los cambios observados en la expresión de estas enzimas glicolíticas parecen ser específicos, basándonos en que los resultados también mostraron que la expresión de otras proteínas glicolíticas, como la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa, no se modificaron en el ventrículo de las ratas SHR.

Otro punto importante de los resultados obtenidos es que debido a la disminución de la expresión de las enzimas fructosa 1,6 bi-fosfato aldolasa y triosafosfato isomerasa, se podría favorecer la acumulación de metabolitos previos a la reacción de dichas enzimas, como la glucosa-6-fosfato. En este sentido, la glucosa-6-fosfato además de ser catabolizada a través de la vía de la glucolisis, es también el primer sustrato para la producción de glucógeno. En relación a esta hipótesis, recientemente se ha publicado un estudio que revela una acumulación de glucógeno cardiaco en pacientes con hipertrofia de ventrículo izquierdo¹⁹². Por otra parte, aunque la mayoría de glucosa consumida es catabolizada hacia piruvato mediante la glucolisis, y posteriormente a acetil-CoA por la PDH, no deberíamos olvidar que existen otras vías metabólicas para la degradación de la glucosa, que constituyen lo que se conoce como metabolismo secundario para la glucosa. Una de las principales vías del metabolismo secundario de la glucosa es la ruta de las pentosas. Zimmer y cols, describieron en diferentes modelos de hipertrofia cardiaca en ratas, que la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la disponibilidad del 5-fosforibosil-1-pirofosfato (derivado de la ribosa-5-fosfato que proviene del ciclo de las pentosas) estaban incrementados en corazones hipertróficos. Estos datos sugieren la posible estimulación del ciclo de las pentosas en el corazón hipertrófico¹⁹². Desafortunadamente, no se han podido identificar proteínas asociadas a la ruta de las pentosas en los proteomas de los ventrículos izquierdos.

1.4 Oxidación de la glucosa

Como se ha comentado en la introducción, el piruvato es el producto final de la glucolisis. El complejo multienzimático denominado PDH cataliza la oxidación de piruvato hasta acetil-CoA. Este complejo multienzimático está localizado en la membrana interna mitocondrial, formado por tres enzimas con actividad catalítica y otras 3 enzimas responsables de la regulación de la actividad catalítica. Por tanto, el

complejo de la PDH podría ser considerado como el factor limitante de la oxidación de la glucosa en el corazón.

En los resultados, se ha observado un aumento de la expresión de la PDH, una de las tres enzimas con actividad catalítica del complejo PDH, en el ventrículo izquierdo hipertrófico de las ratas SHR. En este sentido, la determinación del contenido de piruvato en el ventrículo izquierdo demostró un aumento del mismo en el ventrículo hipertrófico respecto al control. Un resultado paradójico respecto al contenido del piruvato. Podría ser que aunque el contenido de piruvato estaba aumentado en el corazón hipertrófico las dos enzimas reguladoras de la velocidad de la glucólisis, fructosa 1,6 bi-fosfato aldolasa y triosafosfato isomerasa, estuvieran disminuidas en su expresión.

Sin embargo, es importante señalar que este hecho es posible, ya que el piruvato no solo se obtiene de la glucólisis, sino que también puede ser sintetizado como un metabolito intermedio en la degradación aminoacídica del acetyl-CoA.

1.5 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

El producto común de la β -oxidación y la oxidación de la glucosa es el acetyl-CoA. El acetyl-CoA es metabolizado a través del ciclo del ácido tricarboxílico, que sucede en el interior mitocondrial. El estudio proteómico demostró que la expresión de dos enzimas pertenecientes al ciclo del ácido tricarboxílico, isocitrato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa (gracias a la sensibilidad de la proteómica, se han podido identificar hasta cuatro isoformas de esta enzima: dos isoformas mitocondriales y otras dos isoformas citoplasmáticas), no han variado en los ventrículos izquierdos de los corazones hipertróficos cuando fueron comparados con los niveles presentes en corazones sanos de las ratas normotensas. Estos resultados sugieren que el ciclo del ácido tricarboxílico no se ve sometido a modificaciones en ventrículos izquierdos con hipertrofia. Acorde a esta línea de evidencias, Garg y cols, no encontraron modificaciones en los niveles de ARNm codificantes para enzimas implicadas en el ciclo de Krebs en hipertrofia cardíaca asociada a la enfermedad de Chagas¹⁹⁴.

1.6 Proteínas asociadas a la fosforilación oxidativa mitocondrial

El complejo I (NADH deshidrogenasa, flavoproteína) y el complejo II (ubiquinol-citocromo C reductasa) son partes fundamentales de la cadena transportadora de electrones, esta cadena transportadora de electrones mediante sucesivas reacciones redox (oxidación/reducción), genera un potencial electroquímico de hidrogeniones en la membrana interna mitocondrial, que gracias a la acción del complejo proteico ATP sintasa se convertirá en energía, en forma de ATP. Por tanto, la fosforilación oxidativa mitocondrial, es la responsable en último término de la formación de energía, que dependerá de la cantidad de los cofactores NADH y FADH₂ creados en las diferentes vías metabólicas energéticas celulares.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que tanto la enzima ubiquinol-citocromo C reductasa como la NADH deshidrogenasa estaban incrementadas en el ventrículo izquierdo de ratas SHR cuando fueron comparados con los niveles de estas enzimas en los corazones normotensos de las ratas control. Estos resultados podrían reflejar un incremento en los niveles de demanda energética en condiciones de hipertrofia cardíaca. Acorde a estos resultados, el estudio dirigido por Jin y cols observaron también una sobreexpresión de la enzima ubiquinol-citocromo C reductasa y NADH-ubiquinona oxidoreductasa (otra enzima incluida en el complejo I) en ventrículos izquierdos hipertróficos de los animales SHR¹⁷³.

Se requieren elevados niveles de producción energética en la mitocondria en forma de ATP, para satisfacer la continua demanda energética requerida por el corazón. Sin embargo, en estudios recientes se ha mostrado una disminución general del aporte de ATP con el ventrículo izquierdo hipertrófico en ratas SHR, que podría estar aparentemente en discordancia con el incremento de la expresión de las dos enzimas ubiquinol-citocromo C reductasa y NADH deshidrogenasa, descritas en este estudio. Sin embargo, también han sido identificados en los geles bidimensionales las subunidades α - y β - del precursor mitocondrial de la ATP sintasa. Esta ATP sintasa mitocondrial es un complejo proteico que cataliza la formación de moléculas de ATP, mediante fosforilación oxidativa y gracias a un gradiente electroquímico generado por protones. Este complejo enzimático consiste en dos partes bien diferenciadas: la parte Fo que está insertada en la membrana interna mitocondrial y la parte F₁ que tiene la

capacidad de unir los nucleótidos ADP con grupos fosfato y generar las moléculas de ATP. La subunidad β de la F_1 es donde reside la capacidad catalítica de la ATP sintasa aunque es conocido que ambas subunidades α - y β - son esenciales para la actividad enzimática¹⁹⁵.

En la presente tesis, tras realizar el análisis densitométrico de los geles bidimensionales, se observó que la expresión de la subunidad β estaba incrementada mientras que la subunidad α estaba disminuida en los ventrículos izquierdos de los corazones hipertróficos de las ratas SHR. Esta posible inhibición de la síntesis de ATP en ratas SHR con HVI, generada por la baja expresión de una de las subunidades de la ATP sintasa necesarias para la generación de ATP, podría ser la responsable de los reducidos niveles de ATP en ratas hipertróficas que han sido sugeridos por diferentes estudios publicados previamente¹⁹⁶.

1.7 Creatina quinasa

La creatina quinasa M fue identificada en los proteomas de ventrículos izquierdos de rata, estando aumentada su expresión en el grupo de ratas SHR cuando fue comparada con el grupo de ratas normotensas. Este dato puede ser importante, en aquellas condiciones en las que los requerimientos de ATP exceden a los niveles de ATP aportados, es decir en condiciones de deficiencia energética, como ocurre en corazones de ratas con hipertrofia cardiaca. La fosforilación de la creatina, catalizada por la enzima creatina quinasa, es uno de los principales mecanismos que utiliza el corazón para mantener unos niveles adecuados de ATP. Sin embargo, aunque en el presente estudio se ha detectado un incremento de la expresión de la creatina quinasa en el ventrículo izquierdo del corazón de las ratas SHR, estudios previos utilizando diferentes modelos animales han descrito que el “pool” o la cantidad de creatina disponible en ventrículos izquierdos hipertróficos es de hasta un 60% menor comparado con ventrículos izquierdos sanos¹⁹⁷. Recientemente, un estudio dirigido por Smith y cols han descrito que el flujo neto de ATP obtenido a través de la fosforilación de la creatina está muy reducida en humanos con cardiopatía hipertrófica¹⁹⁸. Por tanto, deberíamos ser precavidos con el aumento observado de la expresión de la creatina quinasa, ya que este aumento podría no ser suficiente para compensar la síntesis de ATP debida a la reducción de creatina en los corazones hipertróficos.

1.8 Limitaciones del estudio

La principal limitación del estudio es que sólo se han medido cambios en la expresión proteica de las enzimas. Por tanto, se debería ser cuidadoso con la interpretación, ya que los cambios en los niveles de expresión por sí solos no son suficientes para asignar diferencias en la actividad enzimática. En este sentido, el impacto final de los cambios observados en la expresión de las proteínas puede ser afectado por otros factores como la viabilidad del sustrato, la integridad funcional proteica o la disposición de sus productos entre otros muchos factores y/ o condiciones. Cabe destacar que las alteraciones en el metabolismo energético han emergido como uno de los factores más importantes en el desarrollo de deficiencia de la función contráctil en corazones hipertróficos, y el consecuente fracaso cardíaco. Gracias al uso de nuevas tecnologías, como la proteómica, podemos analizar en profundidad y de forma integrada las alteraciones metabólicas asociadas a la hipertrofia hipertensiva cardíaca. De hecho, bajo las condiciones experimentales seguidas en el desarrollo de los experimentos de esta tesis en el modelo de rata hipertensa, numerosas proteínas implicadas en las principales vías metabólicas energéticas (como la β -oxidación de los ácidos grasos, la glucólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa mitocondrial) estaban aumentadas o disminuidas significativamente, apoyando la idea de que la HVI asociada con disfunción diastólica, es una situación transitoria hacia deficiencias metabólicas energéticas importantes presentes en el fracaso cardíaco y que probablemente ni la oxidación de ácidos grasos ni la glucólisis sean las únicas fuentes de energía en el ventrículo izquierdo hipertrófico.

2.- MODELO DE CORAZÓN DE RATAS CON SOBREPESO

La utilización de los sustratos energético por parte del corazón obeso no ha sido aun estudiada en profundidad. Se han utilizado modelos animales sometidos a ingesta de dietas ricas en grasa donde un alto porcentaje de calorías ingeridas dan como resultado una ganancia en el peso corporal, aumento de la cantidad de grasa corporal e incluso resistencia a la insulina. Estos modelos han mostrado que factores importantes a la hora de que el corazón obeso utilice sustrato energético son los niveles elevados de ácidos grasos y triacilglicerolos circulantes existentes. Estudios experimentales recientes han demostrado que la oxidación de ácidos grasos está aumentada tanto en obesidad como cuando existe resistencia a la insulina⁵⁸. El incremento en la oxidación de ácidos grasos es paralelo a la disminución de la glucólisis. Existen también estudios que demuestran que la oxidación del piruvato y la actividad de la PDH estaban significativamente reducidas en ratones obesos mientras que las enzimas implicadas en la respiración mitocondrial no estaban modificadas, lo cual indica que la obesidad no interfiere con el metabolismo mitocondrial pero sí sobre la oxidación de los carbohidratos. Por lo tanto, la mayoría de estudios experimentales apuntan en la dirección de que la oxidación de los ácidos grasos esta aumentada en corazones obesos sugiriendo que la afectación de la oxidación de ácidos grasos no contribuye a la acumulación lipídica observada en obesidad.

En esta tesis se han analizado de forma integrada diferentes vías metabólicas en un modelo de rata alimentada con DRG. En nuestros resultados, la expresión de varias proteínas asociadas con diferentes rutas metabólicas, principalmente la β -oxidación de ácidos grasos, glucólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la fosforilación oxidativa mitocondrial, estaban modificadas en el ventrículo izquierdo de las ratas DRG mostrando un mayor peso corporal y resistencia a insulina que las ratas control. Los cambios en la expresión de las proteínas relacionadas con estas rutas energéticas metabólicas pueden preceder a trastornos cardiovasculares ya que la funcionalidad miocárdica y el crecimiento del ventrículo no estaban modificados.

2.1 Cambios en la β -oxidación de los ácidos grasos

El músculo cardíaco utiliza la oxidación de los ácidos grasos como principal fuente energética¹⁸⁴. En este sentido, el control intracelular de la oxidación de los ácidos grasos comienza a nivel mitocondrial con el transporte de ácidos grasos por la CPTI, la cual transfiere ácidos grasos desde la acil-CoA a la acilcarnitina de cadena larga, y ésta a su vez es transportada al interior mitocondrial^{199,200}.

En las ratas DRG, la CPTI estaba sobreexpresada en ventrículo izquierdo comparándolas con las ratas control. Esto iba acompañado de una mayor expresión en el ventrículo izquierdo de tres enzimas implicadas en la β -oxidación. Por lo tanto, estos resultados sugerirían que la oxidación de ácidos grasos podría estar favorecida en el ventrículo izquierdo de ratas DRG. Estos resultados están en concordancia con un trabajo publicado por Peterson y cols, en el que se demostró que corazones de mujeres obesas muestran un incremento del consumo de ácidos grasos determinados mediante tomografía de emisión positrónica. Esto está íntimamente relacionado con un incremento del índice de masa corporal y del consumo de oxígeno por parte del miocardio. El aumento del consumo de oxígeno asociado con un incremento en el índice de masa corporal de los sujetos de este estudio se relaciona muy probablemente con el efecto de la obesidad en el remodelado cardíaco debido al hecho de que la obesidad aumenta el metabolismo de ácidos grasos. Además, la obesidad está asociada con una disminución de la transducción de la energía miocárdica hacia el trabajo contráctil y con el remodelado del ventrículo izquierdo. Estas alteraciones son similares a las observadas en modelos animales experimentales de obesidad en el que la contractibilidad cardíaca está dañada en personas obesas¹⁵⁰.

El aumento de los niveles circulantes de colesterol en ratas DRG podría contribuir a estimular la expresión de enzimas relacionadas con la β -oxidación en el ventrículo. Por ello se incluyó la posible correlación entre ambas variables y sin embargo, no se observó asociación entre los niveles circulantes de colesterol total con el nivel de expresión de proteínas asociadas a esta ruta metabólica en ventrículo izquierdo. Por lo tanto, no parece que los diferentes niveles de colesterol circulante estén relacionados con una mayor expresión de proteínas asociadas a la β -oxidación en el ventrículo izquierdo.

Estudios experimentales en corazones perfundidos han mostrado que una oxidación de ácidos grasos acelerada contribuye con un desarrollo de cardiomiopatías diabéticas debido a la inhibición de la oxidación de la glucosa⁵⁹. Además, ha sido también propuesto que tasas elevadas de oxidación de ácidos grasos, en el establecimiento de la obesidad, contribuyen al establecimiento de resistencia a insulina debido a una inhibición directa del metabolismo de la glucosa^{54,55}. Esto sugeriría que en el ventrículo izquierdo, el incremento de la oxidación de ácidos grasos debería reducir la oxidación de carbohidratos. En los resultados de la tesis no observamos ninguna relación entre los niveles circulantes de insulina o el índice HOMA con respecto a alguna de las proteínas identificadas relacionadas con la β -oxidación de ácidos grasos.

2.2 Glucolisis en el ventrículo de ratas alimentadas con dieta alta en grasa

En los ventrículos de ratas DRG, las proteínas relacionadas con la vía glicolítica tales como la triosafosfato isomerasa, las isoformas α/β de la enolasa y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se mostraron sobreexpresadas con respecto a las ratas control. Todo ello, podría estar relacionado con un mecanismo compensatorio para aumentar la degradación de la glucosa la cual podría también estar asociada con una posible reducción en el consumo de glucosa debida a la resistencia a insulina. Sin embargo, el análisis de Pearson no mostró ninguna asociación entre los niveles circulantes de glucosa con cambios en la expresión de triosafosfato isomerasa, isoformas α/β de la enolasa ni gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Un hecho paradójico podría considerarse que aunque en los ventrículos de ratas DRG se observó un incremento en la expresión de enzimas glicolíticas, el contenido total neto de piruvato, el producto final de la glucolisis, no mostró diferencias respecto a los ventrículos control. Varias posibilidades podrían explicar este hallazgo.

La primera posibilidad a valorar podría ser que existiera una degradación acelerada de piruvato hacia la generación de lactato o hacía la producción de acetil-CoA en el ventrículo de las ratas DRG. El contenido de lactato en ventrículo de ratas DRG no era diferente con respecto a las ratas control, lo cual descarta la posibilidad de una degradación del piruvato hacia la ruta anaeróbica. Sin embargo, la expresión de la PDH, una de las tres enzimas que constituyen el complejo de la PDH que regula la oxidación de piruvato a acetil-CoA estaba aumentada en ventrículo izquierdo de ratas DRG.

Además, proteínas implicadas tanto en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos como en la fosforilación oxidativa mitocondrial estaban también sobreexpresadas en los ventrículos de ratas DRG con respecto a ratas control. En conjunto, estas observaciones podrían reflejar un aumento en el nivel de demanda energética en los ventrículos de ratas DRG. En relación a esta hipótesis, la expresión de la creatina quinasa M estaba incrementada en ratas DRG comparado con las ratas control. La creatina quinasa M es un mecanismo que el corazón utiliza para mantener los niveles de ATP cuando la demanda de ATP supera la producción. Estudios en ratones obesos han sugerido un incremento en el consumo de oxígeno por parte del miocardio a pesar de que la eficiencia cardíaca estuviera reducida²⁰¹, lo que sugiere la necesidad de un mayor metabolismo energético.

En la literatura se ha intentado también establecer cual es el balance energético en ratas alimentadas con dietas ricas en ácidos grasos. Esto se ha analizado fundamentalmente en hígado y han demostrado la existencia de un aumento significativo del Pm mitocondrial y una bajada en la relación entre el pH de la mitocondria con el del citosol, lo cual lleva a un desequilibrio en la síntesis de ATP²⁰². Esto sugeriría la existencia de mayores requerimientos de producción de ATP favoreciéndose así la sobreexpresión de las diferentes proteínas relacionadas con rutas metabólicas energéticas observadas en los resultados de esta tesis, como un posible mecanismo defensivo.

2.3 Leptina y metabolismo energético en el ventrículo

La leptina es una hormona que participa en la regulación de la ingesta de alimentos y el peso corporal. Actuando sobre el hipotálamo, la leptina disminuye el apetito e incrementa el gasto energético a través de la activación simpática la cual como consecuencia disminuye el tejido adiposo y el peso corporal. Los niveles de esta hormona están disminuidos durante el ayuno e incrementados tras varios días de sobrealimentación en un esfuerzo para ayudar a regular el balance energético.

Existe una fuerte correlación entre los niveles séricos de leptina y la masa de grasa corporal de individuos obesos sugiriéndose mecanismos endógenos de resistencia a leptina en la obesidad²⁰³. Pocos estudios se han centrado en el efecto de la leptina en el

metabolismo cardíaco y muchos de los efectos se han inferido de estudios de modelos genéticos de deficiencia/resistencia a leptina. Sí se ha observado en corazones aislados que la leptina aumenta tanto la oxidación de ácidos grasos como del metabolismo de la glucosa²⁰⁴. Además, en ratones ob/ob, un modelo genético asociado con la resistencia a leptina, se ha observado un aumento significativo de la oxidación de ácidos grasos y una reducción tanto en la oxidación de la glucosa como en la capacidad oxidativa de la mitocondria²⁰⁵.

En nuestro estudio, los niveles circulantes de leptina estaban significativamente incrementados en ratas DRG con respecto a ratas control. Sin embargo, los niveles de leptina en plasma solo estuvieron asociados con cambios en la expresión en el ventrículo izquierdo del precursor mitocondrial de la acil-CoA-tioester hidrolasa y con la subunidad α del precursor mitocondrial de la flavoproteína. Estos hallazgos sugieren que la participación de la leptina como responsable de los cambios observados en la expresión de las principales proteínas relacionadas con el metabolismo energético en el ventrículo izquierdo de ratas DRG es muy limitada.

El hecho de que la expresión de varias proteínas relacionadas con el metabolismo energético estén modificadas en ventrículos de ratas DRG pero que la funcionalidad cardíaca no se vea afectada podría sugerir que la modificación en la expresión de estas proteínas no sea consecuencia de alteraciones en la funcionalidad miocárdica. Sin embargo, estas modificaciones de expresión podrían ser interpretadas como un mecanismo adaptativo por parte del metabolismo cardíaco al sobrepeso.

Un dato relevante que aportan los resultados de esta parte de esta tesis, es el hecho de que el peso corporal sea el parámetro más asociado con cambios en el nivel de expresión de proteínas del metabolismo energético en ventrículo izquierdo. Esto apoya que el sobrepeso afecta a los requerimientos energéticos del corazón. En este sentido, la ganancia de peso afecta tanto al sistema renina-angiotensina y a las rutas adrenérgicas^{39,41} las cuales como respuesta pudieran contribuir a la modificación de la expresión de estas proteínas metabólicas. Estudios futuros no obstante son necesarios para aclarar dicha hipótesis.

Como resumen, los resultados de esta parte de la tesis realizada en ratas alimentadas con DRG demuestran que antes de que la funcionalidad miocárdica esté

afectada por una DRG y/o sobrepeso, la expresión de proteínas participantes en la producción de energía en el ventrículo izquierdo estaba modificada. Aunque algunos estudios han sugerido como factores importantes a la hora de elegir sustrato energético por parte del corazón a los niveles circulantes de ácidos grasos y a la resistencia a la insulina, los datos aportados en esta tesis sugieren que independientemente de los niveles circulantes de colesterol, glucosa, insulina e incluso a la resistencia a la insulina, las proteínas implicadas en diferentes rutas metabólicas se sobreexpresan en ventrículos izquierdos. Es por ello que probablemente, los cambios a nivel molecular precedan a los cambios funcionales del corazón y particularmente del ventrículo. Por ello, un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares afectados por la ingesta de una DRG podría ayudarnos a prevenir sus consecuencias patológicas.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. La vía de la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga y la vía glucolítica se encuentra reducida en el corazón hipertrófico de SHR. Además se observó un aumento de la fosforilación oxidativa mitocondrial en el corazón hipertrófico de SHR posiblemente debido a la mayor exigencia de consumo de ATP.
2. La β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga y la glucólisis no son probablemente la única fuente de energía que usa el corazón hipertrófico. De hecho, la expresión de creatina quinasa está aumentada en el corazón hipertrófico respecto al normal.
3. En cuanto al consumo de una dieta rica en ácidos grasos saturados, antes de que la función miocárdica se vea afectada por ella y por el sobrepeso, el nivel de expresión de proteínas implicadas en la producción de energía en ventrículo izquierdo se ve modificado a pesar de que la funcionalidad miocárdica y el crecimiento del ventrículo no están todavía modificados.
4. La expresión de proteínas relacionadas con la glucólisis, β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa mitocondrial están aumentadas en corazones de ratas con dieta rica en grasa. Estas modificaciones en la expresión de las anteriores proteínas fueron independientes de los niveles circulantes de colesterol, glucosa, insulina e incluso resistencia a insulina.
5. La leptina está aumentada en las ratas alimentadas con dieta rica en ácidos grasos saturados. Probablemente esto ocurre como mecanismo compensatorio a un mayor acúmulo de grasa inducido por la dieta rica en ácidos grasos saturados. Además, el peso corporal es el parámetro más asociado con cambios en el nivel de expresión de proteínas del metabolismo energético en ventrículo izquierdo. Esto apoya que el sobrepeso afecta a los requerimientos energéticos del corazón.

Figura 22. Resumen de los resultados preexistentes en la literatura sobre el metabolismo energético del corazón normal.

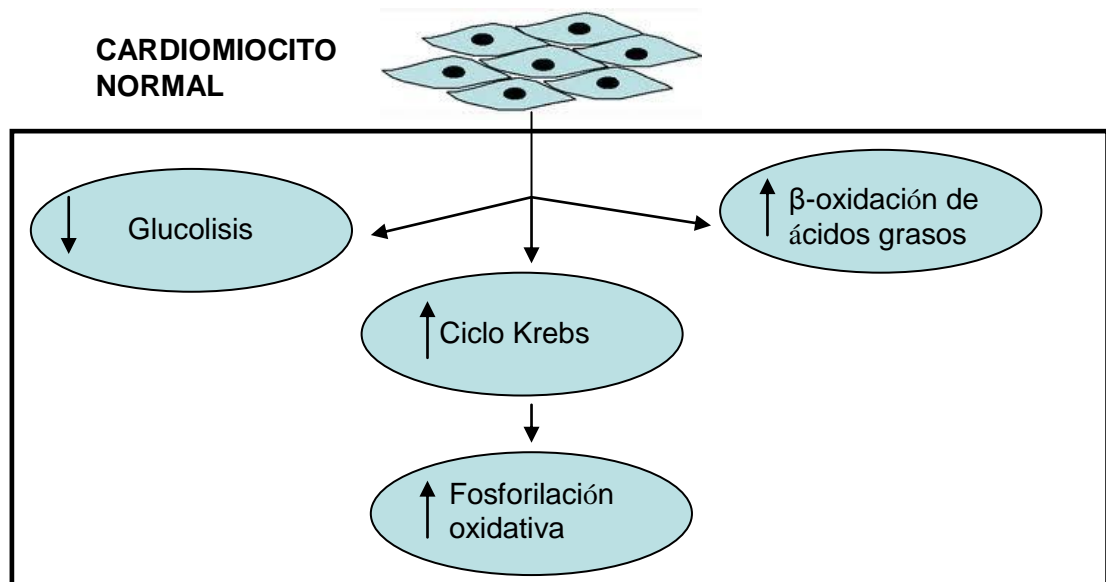
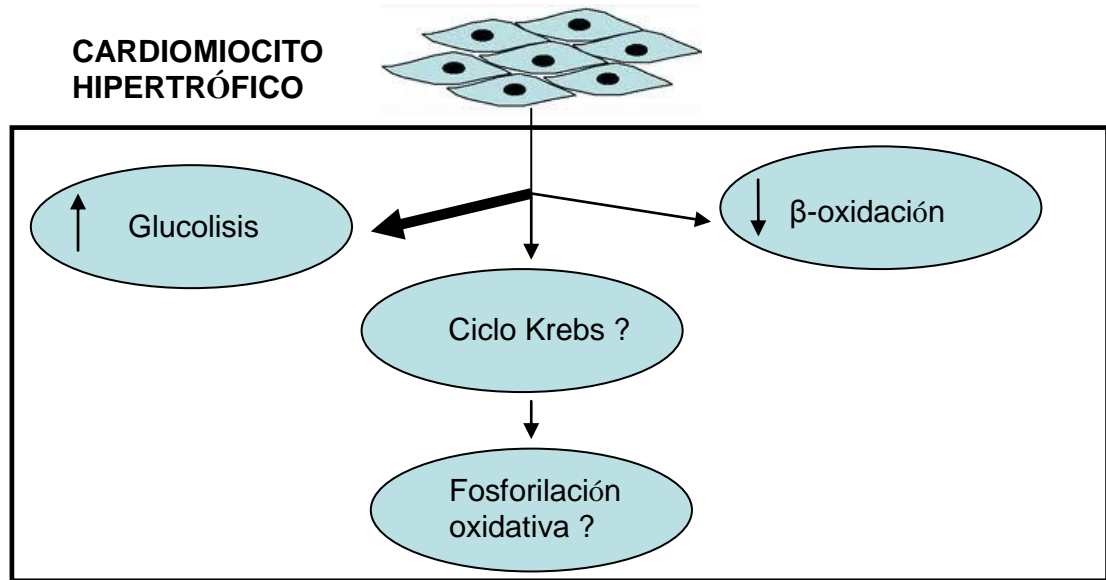


Figura 23. Resumen y comparación de los resultados del modelo animal de corazón hipertrófico de esta tesis con los datos preexistentes en la literatura

RESULTADOS EN LA LITERATURA



RESULTADOS QUE APORTA ESTA TESIS

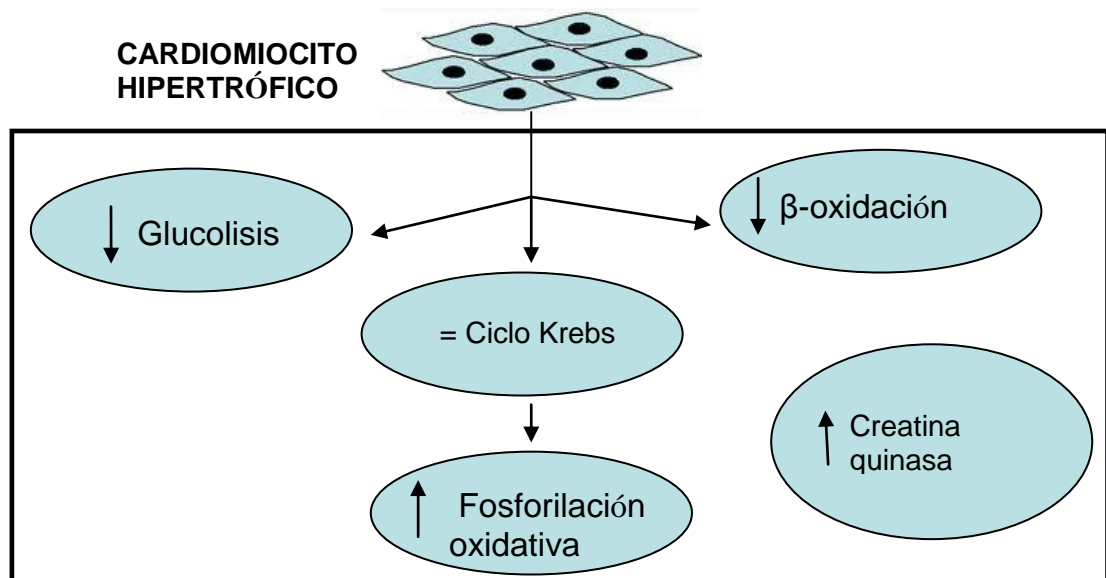
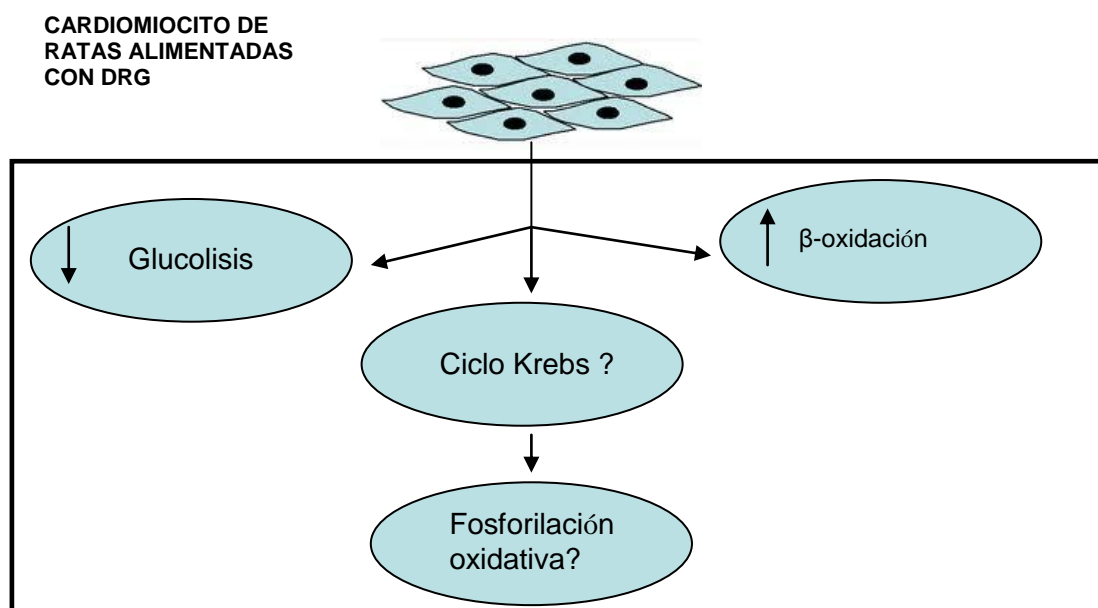
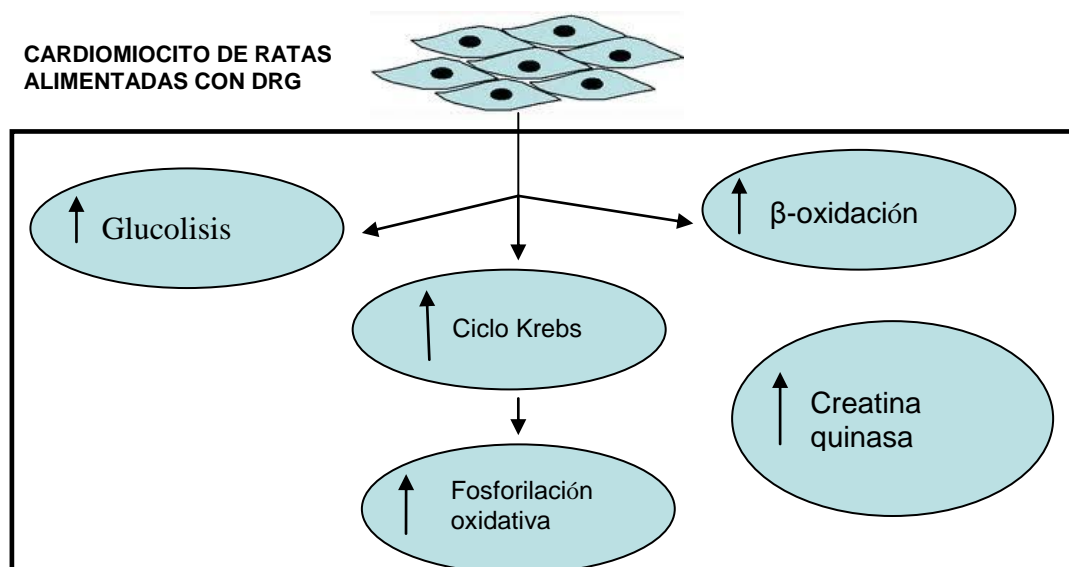


Figura 24. Resumen y comparación de los resultados del modelo animal alimentado con una dieta rica en grasa de esta tesis con los datos preexistentes en la literatura

RESULTADOS EN LA LITERATURA



RESULTADOS QUE APORTA ESTA TESIS



BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Fozzard HA, Jennings RB, Harber E, Katz AM, Morgan HE. The Heart and Cardiovascular System. New York, Raven Press, 1991.
- 2.- Molketin JD , Dichotomy of Ca^{2+} in the heart : contraction versus intracellular signaling . *J Clin Invest* . 2006 ; 116 : 623-6
- 3.- Murphy RA. Contractile mechanism of muscle cells. En: Berne RM, Levy MN. Eds. St. Louis: Mosby, 1998: 269-81.
- 4.- Rayment I, Holden HM, Whittaker M: Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261: 58, 1993.
- 5.- Bers DM: Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res* 87: 275, 2000.
- 6.- Tyska MJ, Dupuis DE, Guilford WH, Patlak JB, Walker GS, Trybus KM, Warshaw DW, Lowey S. Two heads of myosin are better than one for generating force and motion. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4402, 1999
- 7.- Nelson, DL and Cox MM Lehninger principles of biochemistry. 3rd ed. 2000. World publisher.
- 8.- Lopaschuk GD , Belke DD , Gamble J , Itoi T , Schonekess. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease . *Biochim Biophys Acta* . 1994 ; 1213 : 263-276
- 9.- Voet D and J .Voet . 1990 . *Biochemistry* , John wiley and sons
- 10.- Glatz JF , Vork MM , Van Der Vussefatty GJ . Significance of cytoplasmic fatty acid-binding protein for the ischemic heart . *Moll cell Biochem* 1993 , 123 (1-2) : 167-73
- 11.- Saddik M , lopaschuk GD . Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts . *J Biol Chem* . 1991 May 5 ; 266 (13) : 8162-70

- 12.- Stryer L . *Biochemistry* . 4th ed . Freeman and co. 1998 . Cap 24 , “ Fatty acid metabolism “ , pp 603-628.
- 13.- Kudo N , Barr AJ , Barr RL , Desai S , Lopaschuk GD . High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl – CoA levels due to an increase in 5'- amp – activated protein kinase inhibition of acetyl –CoA carboxylasa . *J Biol Chem* . 1995 , 270 (29) : 17513-20
- 14.- Lopaschuk GD , Stanley WC . Manipulation of energy metabolism in the heart . *Science And Medicine* . 1997 , 4 : 42-51
- 15.- Silverman M . Structure and function of hexose transporters . *Ann. Rev Biochem* . 1991 ; 60 : 757-794
- 16.- Goodwin GW , Taylor CS , Taegtmeyer H . Regulation of energy metabolism of the heart during acute increase in heart work . *J Biol Chem* . 1998 ;273 (45) : 29530-9
- 17.- Young ME , Razeghi P , Cedars AM , Guthrie PH , Taegtmeyer H . Intrinsic diurnal variations in cardial metabolism and contractile function . *Cirl Res* . 2001 ; 89 (12) : 1199-208
- 18.- Harris RA , Crabb DW . Metabolic interrelationships , devlin tm. ed . Textbook of biochemistry with clinical correlation . 1997 . 4th edition . Wiley-Liss , pp 525-652
- 19.- Smith TE . Molecular cell biology , devlin tm. ed. Textbook of biochemistry with clinical correlation . 1997 . 4th edition . Wiley-Liss , pp 919-979
- 20.- Beadle RM , Frenneaux M . Modification of myocardial substrate utilisation : A new therapeutil paradigm in cardiovascular disease . *Heart* 2010 ; 96 (11) : 824-30

- 21.- Neely JR , Morgan HE . Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle . *Annu Rev Physiol* . 1974 ; 36 : 413-59
- 22.- Henning SL , Wambolt RB , Schönerkess BO , Lopas Chuk GD , Allard MF . Contribution of glycogen to aerobil myocardial glucose utilization . *Circulation* . 1996 , 93 (8) : 1549-55
- 23.- Christe ME , Rodgers RL . Altered glucose and fatty acid oxidation in hearts of the spontaneously hypertensive rats . *J Mol Cell Cardiol* . 1994 ; 26 :1371-1375
- 24.- Alllard MF , Schönekess BO , Henning SI , English DR , Lopaschuk GD . Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to atp production in hypertrophied hears . *Am J Physiol* . 1994 ; 267 : H742-H750
- 25.- El Alaoui-Talibi Z , Landormy S , Loireau A , Moravec J . Fatty acid oxidation and mechanimal performance of volume-overloaded rat hearts . *Am J Physiol* . 1992 ; 262 : H1068-74
- 26.- El Alaoui-Talibi Z , Guendouz A , Moravel M , Moralvel J . Control of oxidative metabolism in volume-overloaded rat hearts : effect of propionyl-l-carnitine . *Am J Physiol* . 1997 ; 272 : H1615-24
- 27.- Schönekess BO , Allard MF , Lopaschuk GD. Propyonyl-l-carnitine improvement of hypertrophied rat heart function is associated with an increase in cardial efficiency . *Eur J Pharmacol* . 1995 ; 14 : 288 (2) : 155-66
- 28.- Sack MN , Rader TA , Park S , Bastin J , Mc Cune SA , Kelly DP . Fatty acid oxidation enzyme gene expression is down regulated in the failing heart . *Circulation* . 1996 ; 94 : 2837-2842
- 29.- Barger PM , Kelly DP . Fatty acid utilization in the hypertrophied and failing heart : molecular regulatory mechanisms . *Am J Med Sci* . 1999 ; 318 (1) :38-42
- 30.- Randle PJ . Fuel selection in animals. *Biochem Soc Trans* . 1986 ; 14 (5) : 799-806

- 31.- Wambolt RB , Henning SL , English DR , Bondy GP , Allard MF . Regression of
cardial hypertrophy normalizes glucose metabolism and left ventricular function
during reperfusion . *J Mol Cell Cardiol* . 1997 ; 29 (3) : 939-48
- 32.- Wambolt RB , Henning SL , English DR , Dyachkova Y , Lopaschuk GD ,
Allard MF . Glucose utilization and glycogen turnover are accelerated in
hypertrophied rat hearts during severe low-flow ischemia . *J Mol Cell Cardiol* .
1999 ; 31 (3) : 493-502
- 33.- Allard MF , Henning SL , Wambolt RB , Granleese SR , English DR ,
Lopaschuk GD . Glycogen metabolism in the aerobic hypertrofied rat heart .
Circulation . 1997 ; 15 ; 96 (2) : 676-82
- 34.- Wambolt RB , Lopaschuk GD , Brownsey RW , Allard MF . Dichloroacetate
improves post-ischemic function of hypertrophied rat hearts . *J Am Coll Cardiol* .
2000 ; 36 : 1378-1385
- 35.- Leong HS , Brownsey RW , Kulpa JE , Allard MF . Glycolysis and pyruvate
oxidation in cardiac hypertrophy : why so unbalanced ? *Comp Biochem Physiol A
Mol Integr Physiol* . 2003 ; 135 (4) : 499-513
- 36.- Leary SC , Michaud D , Lyons CN , Hale TM , Bushfield TL , Adams MA ,
Moyes CD . Bioenergetic remodeling of heart during treatment of spontaneously
hypertensive rats with enalapril . *Am J Physiol Heart Cirl Physiol* .
2002 ; 283 : H540-H548
- 37.- Wilson PWF , D'agostino RB , Sullivan L , Parise H , Kannel WB . Overweighth
and obesity as determinants of cardiovascular risk : the framingham experience.
Arch Intern Med . 2002 ; 162 : 1867-1872

- 38.- Kenchaiah S , Evans JC , Levy D , Wilson PWF , Benjamin EJ , Larson MG , Kannel WB , Vasan RS . Obesity and the risk of heart failure . *N Engl J Med* . 2002 ; 347 : 305-313
- 39.- Rahmouni K , Correita MLG , Haynes WG , Mark AL . Obesity-associated hypertension : new insights into mechanisms . *Hypertension* . 2005 ; 45 : 9-14
- 40.- Weisinger RS , Begg DP , Chen N , Jois M , Mathai ML , Sinclair AJ . The problem of obesity : is there a role for antagonists of the renin-angiotensin system? *Asia Pac J Clin Nutr* . 2007 ; 16 : 359-367
- 41.- Francis Chetti EA , Genelhu VA . Obesity-hypertension : an ongoing pandemic . *Int J Clin Pract* . 2007 ; 61 : 269-280
- 42.- Lee Y , Naseem RH , Ouplomb L , Park BH , Garry DJ , Richardson JA , Schaffer JE , Unger RH . Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice . *Proc Natl Acad Sci USA* . 2004 ; 101 : 13624-13629
- 43.- Chiu HC , Kovals A , Ford DA , Hsu FF , Garcia R , Herrero P , Saffitz JE , Schaffer JE . A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy . *J Clin Invest* . 2001 ; 107 : 813-822
- 44.- Unger RH , Orci L . Lipotoxic diseases of nonadipose tissue in obesity . *Int J Obes Relat Metab Disord* . 2000 ; 24 : 528-532
- 45.- Boden G , Shulman GI . Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes : defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction . *Eur J Clin Invest* . 2002 ; 32 : 14-23
- 46.- Jacob S , Mascham J , Rett K , Bretcheln K , Volk A , Renn W , Maerker E , Matthaei S , Schick F , Claussen CD , Haring HU . Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects . *Diabetes* . 1999 ; 48 : 1113-1119

- 47.- Berger J , Moller DE . The mechanisms of actions of PPARs . *Ann Rev Med* .
2002 ; 53 : 409-435
- 48.- Huss JM , Kelly DP . Nuclear receptors signaling and cardial energetics . *Cir Res* .
2004 ; 95 : 568-578
- 49.- Chen L , Ding G , Qin Q , Huang Y , Lewis W , He N , Evans RM , Schneider MD,
Brako FA , Xiao Y , Chen YE , Yang Q . Cardiomyocyte restricted peroxisome
proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid
oxidation and leads to cardiomyopathy . *Nat Med* . 2004 ; 10 : 1245-1250
- 50.-Dyck JR , Barr AJ , Barr RL , Kolattukudy PE , Lopaschuk GD . Characterization
of cardial malonyl-CoA decarboxylase and its putative role in regulating fatty acid
oxidation . *Am J Physiol* . 1998 ; 275 : H2122-H2129
- 51.- Dych JR , Lopaschuk GD . Malonyl CoA control of fatty acid oxidation in the
ischemic heart . *J Mol Cell Cardiol* . 2002 ; 34 : 1099-1109
- 52.- Awan MM , Saggerson ED . Malonyl-CoA metabolism in cardial myocytes and its
revelance to the control of fatty acid oxidation . *Biochem J* . 1993 ; 295 : 61-66
- 53.-Oodwin GW , Taegtemeyer H . Regulation of fatty acid oxidation of the hearts by
mcd and acc during contractil stimulation . *Am J Physiol* . 1999 ; 277 : E772-E777
- 54.- Aasum E , Hafstad AD , Severson DL , Larsen TS . Age-dependent changes in
metabolism , contractile function and ischemic sensitivity in hearts from db/db
mice . *Diabetes* . 2003 ; 52 : 434-441
- 55.- Mazumder PK , O'neill BT , Roberts MW , Buchanan J , Yun UJ , Cooksey RC ,
Boudinas S , Abel ED . Impaired cardial efficiency and increased fatty acid
oxidation in insulin-resistannt ob/ob mouse hearts . *Diabetes* . 2044 ; 53 : 2366-
2374

- 56.-Carley AN , Severson DL . Fatty acid Metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts . *Biochem Biophys Acta* . 2005 ; 1734 : 112-116
- 57.- Carroll R , Carley AN , Dych JR , Severson DL . Metabolic effects of insulin on cardiomyocytes from control and diabetic db/db mouse hearts . *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 ; 288 : E900-E906
- 58.- Lopaschuk GD . Metabolic abnormalities in the diabetic heart . *Heart Fail Rev* . 2002 ; 7 : 149-159
- 59.- How OJ , Aasum E , Kunnathu S , Severson DL , Myhre ESP , Larsen TS . Influence of substrate supply on cardiac efficiency as measured by pressure-volume analysis in ex vivo mouse hearts . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 2005 ; 288 : H2979-H2985
- 60.-How OJ , Aasum E , Severson DL , Chan WYA , Essop MF , Larsen TS . Increased myocardial oxygen consumption reduces cardiac efficiency in diabetic mice . *Diabetes* . 2006 ; 55 : 466-473
- 61.- Rodrigues B , Cam MC , McNeill JC . Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy . *Mol Cell Biochem* . 1998 ; 180 : 53-57
- 62.- Liv B , El Alaoui-Talibi Z , Clanachan AS , Schulz R , Lopaschuk GD . Uncoupling of contractile function from mitochondrial TCA cycle activity and MV02 during reperfusion on ischemic hearts . *Am J Physiol* . 1996 ; 270 : H72-H80
- 63.- Stanley WC , Lopaschuk GD , Kivilo KM . Alterations in myocardial energy metabolism in streptozotocin diabetes in : McNeill , ed experimental models of diabetes . Boca raton , fla : CRC Press ; 1999 : 19-38

- 64.- Tahiliani AG , Lopaschuk GD , McNeill JH . Effect of insulin treatment on long-term diabetes-induced alterations of myocardial function . *Gen Pharmacol* 1984 ; 15 : 545-547
- 65.- Stanley WC , Lopaschuk GD , McCormack JC . Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart . *Cardiovasl Res* . 1997 ; 34 : 25-33
- 66.- Liv B , Clanachan AS , Schulz R , Lopaschuk GD . Cardial efficiency is improved after ischemia by altering both the source and fate of protons. *Circ Res* 1996 ; 79 : 940-948
- 67.- Yildiz BO, Suchard MA, Wong M-L, McCann SM, Licinio J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:10434 –10439
- 68.- Kobayashi K, Inoguchi T. Adipokines: therapeutic targets for metabolic syndrome. *Curr Drug Targets*. 2005;6:525–529.
- 69.- Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett*. 2006;580:2917–2921.
- 70.- Matsuzawa Y. Therapy insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3:35– 42.
- 71.- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 257:79–83.

- 72.- Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*. 2003;46:459–469.
- 73.- Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/ adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:10308 –10313.
- 74.- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003;423:762–769.
- 75.- Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N, Walsh K. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2- dependent mechanisms. *Nat Med*. 2005;11:1096 –1103.
- 76.- Shibata R, Ouchi N, Ito M, Kihara S, Shiojima I, Pimentel DR, Kumada M, Sato K, Schiekofer S, Ohashi K, Funahashi T, Colucci WS, Walsh K. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med*. 2004;10:1384 –1389.
- 77.- Ouchi N, Shibata R, Walsh K. Targeting adiponectin for cardioprotection. *Expert Opin Ther Targets*. 2006;10:573–581.

- 78.- Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004;279:1304–1309.
- 79.- Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278:45021–45026.
- 80.- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 1996;334:292–295
- 81.- Lollmann B, Gruninger S, Stricker-Krongrad A, Chiesi M. Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238:648–652.
- 82.- Atkinson LL, Fischer MA, Lopaschuk GD. Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis. *J Biol Chem.* 2002; 277:29424–29430.
- 83.- Palanivel R, Eguchi M, Shuralyova I, Coe I, Sweeney G. Distinct effects of short- and long-term leptin treatment on glucose and fatty acid uptake and metabolism in HL-1 cardiomyocytes. *Metabolism.* 2006;55: 1067–1075.
- 84.- Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature.* 1997;389:374–377.
- 85.- Barrett EJ, Schwartz RG, Francis CK, Zaret BL. Regulation by insulin of myocardial glucose and fatty acid metabolism in the conscious dog. *J Clin Invest* 1984;74:1073–1079.

- 86.- Garland PB, Randle PJ. Regulation of glucose uptake by muscle. X. Effects of alloxan-diabetes, starvation, hypophysectomy and adrenalectomy and of fatty acids, ketone bodies and pyruvate on the glycerol output and concentrations of free fatty acids, long-chain fatty acyl coenzyme A, glycerol phosphate and citrate cycle intermediates in rat hearts and diaphragm muscles. *Biochem J* 1964;93:678–687.
- 87.- Morgan HE, Cadenas E, Regan DM. Regulation of glucose uptake in muscle. II. Rate-limiting steps and effects of insulin and anoxia in heart muscle from diabetic rats. *J Biol Chem* 1961;236:262–268.
- 88.- Newsholme EA, Randle PJ. Regulation of glucose uptake by muscle. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan diabetes, starvation, hypophysectomy and adrenalectomy, on the concentrations of hexose phosphates, nucleotides and inorganic phosphate in perfused rat heart. *Biochem J* 1964;93:641–65
- 89.- Camps MA, Castello P, Munoz M, et al. Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 muscle-fat. glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. *Biochem J* 1992;282:765–772.
- 90.- Garvey WT, Hardin D, Juhaszova M, Dominguez JH. Effects of diabetes on myocardial glucose transport system in rats: implications for diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol* 1993;264:H837–H844.
- 91.- Gamble J, Lopaschuk GD. Glycolysis and glucose oxidation during reperfusion of ischemic hearts from diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 1994;1225:191–199.
- 92.- Wall SR, Lopaschuk GD. Glucose oxidation rates in fatty acid-perfused isolated working hearts from diabetic rat. *Biochim Biophys Acta* 1989;1006:97–103.

- 93.- Chen V, Ianuzzo CD, Fong BC, Spitzer JJ. The effects of acute and chronic diabetes on myocardial metabolism in rats. *Diabetes* 1984;33:1078–1084.
- 94.- Chappell JD, Robinson BH. Penetration of the mitochondrial membrane by tricarboxylic acid anions. *Biochem Soc Symp* 1968;27:123–133
- 95.- Randle PJ, Priesman DA. Short term and longer term regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. In: Patel MS, Roche TE, Harris RA, eds. *Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1996:151–161.
- 96.- Chatham JC, Forder JR. A C-NMR study of glucose oxidation in the intact functioning rat heart following diabetes-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:1203–1213.
- 97.- Avogaro A, Nosadini R, Doria A, et al. Myocardial metabolism in insulin-deficient diabetic humans without coronary artery disease. *Am J Physiol* 1990;258:E606–E618.
- 98.- Hall JL, Stanley WC, Lopaschuk GD, et al. Impaired pyruvate oxidation but not glucose uptake in diabetic pig heart during dobutamine stress. *Am J Physiol* 1996;271:H2320–H2329
- 99.- Randle PJ, Hales CN, Garland PB, Newsholme EA The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetic mellitus. *Lancet* 1963;1:785–789.
- 100.- Wieland O, Siess E, Schulze-Wethmar FH, Funcke HG, Winton B. Active and inactive forms of pyruvate dehydrogenase in rat heart and kidney: effect of diabetes, fasting and refeeding on pyruvate dehydrogenase interconversion. *Arch Biochem Biophys* 1971;143:593–601.
- 101.- Yeaman SJ. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem J* 1989;257:625–632.

- 102.- Kerbey AL, Radcliffe PM, Randle PJ. Diabetes and the control of pyruvate dehydrogenase in rat heart mitochondria by concentration ratios of adenosine triphosphate/adenosine diphosphate, of reduced/oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide and acetylcoenzyme A. *Biochem J* 1977;164:509–519
- 103.- Kuo TH, Giacomelli F, Wiener J, Lapanowski-Netzel K. Pyruvate dehydrogenase activity in cardiac mitochondria from genetically diabetic mice. *Diabetes* 1985;34:1075–1081.
- 104.- Lopaschuk GD. Abnormal mechanical function in diabetes: relationship to altered myocardial carbohydrate/lipid metabolism. *Coron Artery Dis* 1996;7:116–123
- 105.- Kuo TH, Moore KH, Giomelli F, Wiener J. Defective oxidative metabolism of heart mitochondria from genetically diabetic mice. *Diabetes* 1983;32:781–787.
- 106.- Pierce GN, Dhalla NS. Heart mitochondrial function in chronic experimental diabetes in rats. *Can J Cardiol* 1984;1:48–54.
- 107.- Savabi F. Mitochondrial creatine phosphokinase deficiency in diabetic rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;154:469–475.
- 108.- Strauer BE, Motz W, Schwartzkopff B, Vester E, Leschke M, Scheler S. The heart in hypertension. En: Swales JD, editor. Textbook of hypertension. Oxford: Blackwell, 1994: 712-731).
- 109.- Hallback M, Weiss L. Mechanisms of spontaneous hypertension in rats. *Med Clin North Am* 1977; 61: 593-609.
- 110.- Van Empel VP, De Windt LJ. Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act. *Cardiovasc Res*. 2004;63(3):487-99.
- 111.- Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*. 2003;92(2):139-50.

- 112.- Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 2003;65:45-79.
- 113.- Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*;93(2):215-28.
- 114.- Clerk A, Sugden PH. Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ Res*. 2000;86(10):1019-23.
- 115.- Wettschureck N, Rütten H, Zywietz A, Gehring D, Wilkie TM, Chen J, Chien KR, Offermanns S. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of $\text{G}\alpha_{\text{q}}/\text{G}\alpha_{11}$ in cardiomyocytes. *Nat Med* 2001;7(11):1236-40.
- 116.- Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J*. 2001;141(3):334-41.
- 117.- Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 1990;322(22):1561-6.
- 118.- Dorn GW 2nd, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res*. 2003;92(11):1171-5.
- 119.- Schaub MC, Hefti MA, Zuellig RA, Morano I. Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms. *Cardiovasc Res*. 1998;37(2):381-404.

- 120.- Mathew J, Sleight P, Lonn E, Johnstone D, Pogue J, Yi Q, Bosch J, Sussex B, Probstfield J, Yusuf S; Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Investigators. Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. *Circulation*. 2001;104(14):1615-21.
- 121.-Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000;102(4):470-9
- 122.-Schneider, Parker TG. Molecular mechanisms of cardiac growth and hypertrophy: myocardial growth factors and proto-oncogenes in development and disease. *Molecular Basis of Cardiology*.1993:113-134
- 123.-Samarel AM. Hemodynamic overload and the regulation of myofibrillar protein degradation. *Circulation*. 1993;87:1418-1420.
- 124.-Dzau VJ. Local contractile and growth modulators in the myocardium. *Clin. Cardiol* 1993, 16 (suppl 2): 5-9.
- 125.-Morgan HE, Baker KM. Molecular and cellular control of cardiac growth and hypertrophy. In the heart, arteries and veins, edn 8. Edited by Schlant RC, Alexander RW. New York: MacGraw-Hill Inc; 1994:165-171.
- 126.- Kawaguchi H, Sano H, Iizuka K, Okada H, Kudo T, Kageyama K, Muramoto S, Murakami T, Okamoto H, Mochizuki N. Phosphatidylinositol metabolism in hypertrophic rat heart. *Circ Res*. 1993(5):966-72
- 127.- Ruknudin A, Sachs F, Bustamante JO. Stretch-activated ion channels in tissue-cultured chick heart. *Am J Physiol* 1993, 264:H960-H972.
- 128.- MacLellan WR, Brand T, Schneider MD. Transforming growth factor-beta in cardiac ontogeny and adaptation. *Circ Res*. 1993 Nov;73(5):783-91.

- 129.-Dzau VJ. Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure. *Arch Intern Med.* 1993;153(8):937-42.
- 130.- Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell.* 1993;75(5):977-84.
- 131.- Kojima M, Shiojima I, Yamazaki T, Komuro I, Zou Z, Wang Y, Mizuno T, Ueki K, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Yazaki Y. Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signalling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Circulation.* 1994;89(5):2204-11.
- 132.- Mukherjee DP, McTiernan CF, Sen S. Myotrophin induces early response genes and enhances cardiac gene expression. *Hypertension.* 1993;21(2):142-8.
- 133.-Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res.* 1993;27(3):341-8.
- 134.-Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26(7):809-20
- 135.-Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res.* 1993;73(3):413-23.
- 136.-Suzuki J, Matsubara H, Urakami M, Inada M. Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circ Res.* 1993;73(3):439-47.
- 137.-Reaven GM. Banting lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988;37:1595-1607.

- 138.-Liese AD, Mayer-Davis EJ, Haffner SM. Development of the multiple metabolic syndrome: an epidemiologic perspective. *Epidemiol Rev.* 1998;20:157-172).
- 139.-Balkau B, Vernay M, Mhamdi L, Novak M, Arondel D, Vol S, Tichet J, Eschwege E: The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. *Diabetes Metab* 2003,29:526-532.
- 140.-Sattar N, Gaw A, Scherbakova O, Ford I, O'Reilly DS, Haffner SM, Isles C, Macfarlane PW, Packard CJ, Cobbe SM, Shepherd J: Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2003, 108:414-419
- 141.-Israili ZH, Lyoussi B, Hernandez-Hernandez R, Velasco M: Metabolic syndrome: treatment of hypertensive patients. *Am J Ther* 2007, 14:386-402;
- 142.-González Juanatey JR, Alegría E, Lozano JV, Llisteri JL, García JM, González I. Impacto de la hipertensión en la cardiopatías en España. Estudio CARDIOTENS 1999. *Rev Esp Cardiol.* 2001;54:139-49
- 143.- Okosum IS, Liao Y, Rotimi CN, Prewitt TE, Cooper RS. Abdominal adiposity and clustering of multiple metabolic syndrome in white, black and hispanic americans. *Ann Epidemiol.* 2000;10:263-70.
- 144.- Miranda JP, De Fronzo RA, Califf RM. Guyton JR. Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology and mechanisms. *Am Heart J.* 2005;149:33-45.
- 145.- Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance , and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:972-8.

- 146.- Sharma N, Okere IC, Duda MK, Chess DJ, O'Shea KM, Stanley WC. Potential impact of carbohydrate and fat intake on pathological left ventricular hypertrophy *Cardiovasc Res.* 2007;73:257-268
- 147.- Krauss RM, Eckel RH, Howard B Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, Erdman JW Jr, Kris-Etherton P, Goldberg IJ, Kotchen TA.. 2000 AHA Dietary Guidelines. A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation*; 102, 2284-2299
- 148.- Zamorano-León JJ, Modrego J, Mateos-Cáceres PJ, Macaya C, Martín-Fernández B, Miana M, de las Heras N, Cachofeiro V, Lahera V, López-Farré AJ. 2010 A proteomic approach to determine changes in proteins involved in the myocardial metabolism in left ventricles of spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem*; 25, 347-358.
- 149.- Wang P, Lloyd SG, Zeng H, Bonen A, Chatham JC. 2005 Impact of altered substrate utilization on cardiac function in isolated hearts from Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 288, H2102-H2110.
- 150.- Peterson LR, Herrero P, Schechtman KB, Racette SB, Waggoner AD, Kisrieva-Ware Z, Dence C, Klein S, Marsala J, Meyer T. 2004 Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. *Circulation*; 109, 2191-2196.
- 151.- Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res.* 1998;39(1):77-88.
- 152.- Frohlich ED, Pfeffer MA. Adrenergic mechanisms in human hypertension and in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1975;2:225s-238s.

- 153.-Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam MA, Diwan V, Kauter K, Sernia C, Campbell F, Ward L, Gobe G, Fenning A, Brown L. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;57(5):611-24.
- 154.- Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 1998;19:1853–61.
- 155.- Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999;17:121–7.
- 156.- P. James. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly reviews of biophysics* 1997;30:279–331.
- 157.- Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature* 2008;452:571-9.
- 158.- Weiss W, Görg A. High-resolution two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol.* 2009;564:13-32.
- 159.- Keren H, Lev-Maor G, Ast G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet* 2010;11:345-55.
- 160.- Simon Rogers, Mark Girolami, Walter Kolch, Katrina M. Waters, Tao Liu, Brian Thrall and H. Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. *Bioinformatics* 2008; 24: 2894–2900.
- 161.- Vikas Dhingraa, Mukta Gupta, Tracy Andacht,Zhen F. New frontiers in proteomics research: A perspective. *International Journal of Pharmaceutics* 2005;299: 1–18.
- 162.- Wilm M. Quantitative proteomics in biological research. *Proteomics* 2009;9:4590-605.

- 163.- Bjellquist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sanchez, J.C. & Hochstrasser, D. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* 1993;14:1357-65.
- 164.- Andersen, J.S. & Mann, M. Functional genomics by mass spectrometry. *FEBS Lett* 2000;480:25-31.
- 165.- Patel, V.B., Sandhu, G., Corbett, J.M., Dunn, M.J., Rodrigues, L.M., Griffiths, J.R., Wassif, W., Sherwood, R.A., Richardson, P.J. A comparative investigation into the effect of chronic alcohol feeding on the myocardium of normotensive and hypertensive rats: an electrophoretic and biochemical study. *Electrophoresis* 2003;21:2454–2462.
- 166.- Toraason, M., Moorman, W., Mathias, P.I., Fultz, C., Witzmann, F. Two-dimensional electrophoretic analysis of myocardial proteins from lead-exposed rabbits. *Electrophoresis* 1997;18:2978–2982
- 167.- Li XP, Pleissner KP, Scheler C, Regitz-Zagrosek V, Salnikow J, Jungblut PR. A two-dimensional electrophoresis database of rat heart proteins. *Electrophoresis* 1999;20:891-897.
- 168.- Boersma, E. et al. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials. *Lancet* **359**, 189-98 (2002).
- 169.- Deckelaum Li, S.F. (ed.) Tirofiban, a nonpeptido inhibitor of the platelet glycoprotein IIb-IIIa receptor. (Marcel Dekker, New York, 1997).

- 170.- Molero L, García-Méndez A, Alonso-Orgaz S, Carrasco C, Macaya C, López-Farré AJ. Proteomic approach to identify changes in protein expression modified by 17beta-oestradiol in bovine vascular smooth muscle cells. *Clin Sci* 2005;109:457-463.
- 171.-Lopez-Farre, A. et al. Reduction of the soluble cyclic GMP vasorelaxing system in the vascular wall of stroke-prone spontaneously hypertensive rats: effect of the alpha1 -receptor blocker doxazosin. *J Hypertens* 2002;20: 63-70.
- 172.-Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000;23:57-63.
- 173.- Jin X, Xia L, Wang LS, Shi JZ, Zheng Y, Chen WL, Zhang L, Liu ZG, Chen GQ, Fang NY. Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rat. *Proteomics* 2006;6:1948-1956.
- 174.- Zhou SG, Zhou SF, Huang HQ, Chen JW, Huang M, Liu PQ. Proteomic analysis of hypertrophied myocardial protein patterns in renovascularly hypertensive and spontaneously hypertensive rats. *Proteome Res* 2006;11:2901-2908.
- 175.- Hallback M, Weiss L. Mechanisms of spontaneous hypertension in rats. *Med Clin North Am* 1977;61:593-609.
- 176.-Z. Li, O. H. Bing, X. Long, K. G. Robinson, E. G. Lakatta. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Heart* 1997;272:H2313-H2319.
- 177.- Kannel W.B. Hypertension as a risk for cardiac events – epidemiological results of long-term studies. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21:S27–S37.

- 178.- Mitchell GF, Pfeffer JM, Pfeffer MA. The transition to failure in the spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1997; 10: 120S-126S.
- 179.- Okayama H, Hamada M, Kawakami H, Ikeda S, Hashida H, Shigematsu Y, Hiwada K. Increased contraction of myocytes isolated from young spontaneously hypertensive rat. Relationship between systolic and diastolic function. *Am J Hypertens* 1998; 11: 349-356.
- 180.- Brilla CG, Janicki JS, Weber KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ Res* 1991; 69: 107-115.
- 181.- Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH. Diastolic heart failure-abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med* 2004; 350: 1953-1959.
- 182.- Kitzman DW, Little WC, Brubaker PH, Anderson RT, Hundley WG, Marburger CT, Brosnihan B, Morgan TM, Stewart KP. Pathophysiological characterization of isolated diastolic heart failure in comparison to systolic heart failure. *JAMA* 2002; 288: 2144-2150.
- 183.- Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Fujii N, Miyazaki H, Kakinuma Y, Matsuda M, Yamaguchi I. Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertens Res* 2003; 26: 829-837.
- 184.- Taegtmeyer H. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr Probl Cardiol* 1994; 19: 59-113.

- 185.- de las Fuentes L, Soto PF, Cupps BP, Pasque MK, Herrero P, Gropler RJ, Waggoner AD, Dávila-Román VG. Hypertensive left ventricular hypertrophy is associated with abnormal myocardial fatty acid metabolism and myocardial efficiency. *J Nucl Cardiol* 2006; 13: 369-377.
- 186.- Pande SV, Parvin R. Characterization of carnitine acylcarnitine translocase system of heart mitochondria. *J Biol Chem* 1976; 251: 6683-6691.
- 187.- Eaton S. Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res* 2002; 41: 197-239.
- 188.- Gerber LK, Aronow BJ and Matlib MA. Activation of a novel long-chain free fatty acid generation and export system in mitochondria of diabetic rat hearts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 291: 1198-1207.
- 189.- Taegtmeier H, Overturf ML. Effects of moderate hypertension on cardiac function and metabolism in the rabbit. *Hypertension* 1998; 11: 416-426.
- 190.- Allard MF, Schönekeess BO, Henning SL, English DR, Lopaschuk GD. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol* 1994; 267: H742-H750.
- 191.- Liao R, Jain M, Cui L, D'Agostino J, Aiello F, Luptak I, Ngoy S, Mortensen RM, Tian R Cardiac-specific overexpression of GLUT1 prevents the development of heart failure due to pressure-overload in mice. *Circulation* 2002; 106: 2125-2131.
- 192.- Arad M, Maron BJ, Gorham JM, et al. Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2005; 352: 362-372.
- 193.- Zimmer HG, Ibel M, Gerlach E. Significance of the hexose monophosphate shunt in experimentally induced cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 1980; 75: 207-213.

- 194.- Garg N, Gerstner A, Bhatia V, DeFord J, Papaconstantinou J. Gene expression analysis in mitochondria from chagasic mice: alterations in specific metabolic pathways. *Biochem J* 2004; 381: 743-752.
- 195.- Omote H, Park MY, Maeda M, Futai M. The alpha/beta subunit interaction in H(+)-ATPase (ATP synthase). An Escherichia coli alpha subunit mutation (Arg-alpha 296-->Cys) restores coupling efficiency to the deleterious beta subunit mutant (Ser-beta 174-->Phe). *J Biol Chem* 1994; 269: 10265-10269.
- 196.- Shen W, Asai K, Uechi M, et al. Progressive loss of myocardial ATP due to a loss of total purines during the development of the heart failure in dogs. *Circulation* 1999; 100: 2113-2118.
- 197.- Tian R, Ingwall JS. The molecular energetics of the failing heart from animal models-small animal models. *Heart Failure Rev* 1999; 4: 235-253.
- 198.- Smith CS, Bottomley PA, Schulman SP, Gerstenblith G, Weiss RG. Altered creatine kinase adenosine triphosphate kinetics in failing hypertrophied human myocardium. *Circulation* 2006; 114: 1151-1158.
- 199.- McGarry JD, Foster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 1980;49:395-420.
- 200.- McGarry JD, Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev* 1989;5:271-284.
- 201.- Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel Dale E. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. 2005 *Circulation*;112:2686-2695.

- 202.- Mollica MP, Iossa S, Liverini G, Soboll S.. Steady state changes in mitochondrial electrical potential and proton gradient in perfused liver from rats fed a high fat diet. 1998 *Mol Cell Biochem*;178:213-217.
- 203.- Considine RV, Caro JF. Leptin in humans: current progress and future directions. *Clin Chem* 1996;42:843-4.
- 204.- Haap M, Houdali B, Maerker E, Renn W, Machicao F, Hoffmeister HM. Insulin-like effect of low-dose leptin on glucose transport in Langendorff rat hearts. *Exp Clin Endocrinol; Diabetes* 2003;111: 139-145.
- 205.- Buchanan J, Mazumder PK, Hu P , Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology* 2005;146:5341-5349.

ANEXO

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en revistas internacionales de alto índice de impacto. A continuación, se adjunta una copia de cada una de las publicaciones.

A Proteomic Approach to Determine Changes in Proteins Involved in the Myocardial Metabolism in Left Ventricles of Spontaneously Hypertensive Rats

Jose J. Zamorano-León, Javier Modrego, Petra J. Mateos-Cáceres, Carlos Macaya, Beatriz Martín-Fernández*, María Miana*, Natalia de las Heras*, Victoria Cachofeiro*, Vicente Lahera* and Antonio J. López-Farré

Cardiovascular Research Unit, Cardiovascular Institute, Hospital Clínico San Carlos and *School of Medicine, Complutense University, Madrid

Key Words

Myocardial metabolism • Hypertension • Proteomics

Abstract

Background: Different works have suggested that in the hypertrophied heart the energy metabolic pathway shifts to glycolysis. Our aim was to evaluate using proteomics the expression of proteins associated with different energetic metabolic pathways in hypertrophied left ventricles of spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods:** 24-weeks-old SHR with stable hypertension and established left ventricle hypertrophy were used. Normotensive Wistar Kyoto rats were used as control. Proteins from left ventricles were analyzed by 2-dimensional electrophoresis and identified by comparison with a virtual rat heart proteomic map and mass spectrometry. **Results:** Enoyl-CoA hydratase expression, an enzyme involved in fatty acid β -oxidation, was reduced whereas the expression of other β -oxidation enzymes, 3-ketoacyl-CoA thiolase and the mitochondrial precursor of acyl-CoA thioester hydrolase, was increased in the hypertrophied left ventricles. The expression of two enzymes involved in the first steps of glycolysis, fructose biphosphate aldolase and triosephosphate

isomerase, was reduced in the left ventricle of SHR. Pyruvate dehydrogenase expression, enzyme involved in glucose oxidation, was enhanced in the hypertrophied ventricles whereas proteins of the tricarboxylic acid cycle were not modified. Proteins involved in the mitochondrial oxidative phosphorylation were overexpressed whereas the α -subunit of the mitochondrial precursor of ATP synthase was downexpressed. **Conclusions:** Several proteins involved in the main energy metabolic pathways were up and downexpressed. Moreover, our results seem to suggest that probably neither fatty acid β -oxidation nor glycolysis are the only sources for energy in the hypertrophied left ventricle.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

Cardiac hypertrophy and more particularly left ventricular hypertrophy have been considered as a useful adaptive mechanism for the increased cardiac after load in patients with hypertension [1]. Although left ventricular hypertrophy is a leading cause of congestive heart failure, the transition to failure is not completely understood, in

Changes in cardiac energy metabolic pathways in overweighted rats fed a high-fat diet

Javier Modrego · Natalia de las Heras · Jose J. Zamorano-León ·
Petra J. Mateos-Cáceres · Beatriz Martín-Fernández · Maria Valero-Muñoz ·
Vicente Lahera · Antonio J. López-Farré

Received: 27 December 2011 / Accepted: 25 May 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract

Background Heart produces ATP through long-chain fatty acids beta oxidation.

Purpose To analyze whether in ventricular myocardium, high-fat diet may modify the expression of proteins associated with energy metabolism before myocardial function was affected.

Methods Wistar Kyoto rats were divided into two groups: (a) rats fed standard diet (control; $n = 6$) and (b) rats fed high-fat diet (HFD; $n = 6$). Proteins from left ventricles were analyzed by two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and Western blotting.

Results Rats fed with HFD showed higher body weight, insulin, glucose, leptin and total cholesterol plasma levels as compared with those fed with standard diet. However, myocardial functional parameters were not different between them. The protein expression of 3-ketoacyl-CoA thiolase, acyl-CoA hydrolase mitochondrial precursor and enoyl-CoA hydratase, three long-chain fatty acid β -oxidation-related enzymes, and carnitine-*O*-palmitoyltransferase I was significantly higher in left ventricles from HFD rats. Protein expression of triosephosphate isomerase was higher in left ventricles from HFD rats than in those from control. Two α/β -enolase isotypes and glyceraldehyde-3-phosphate

isomerase were significantly increased in HFD rats as compared with control. Pyruvate and lactate contents were similar in HFD and control groups. Expression of proteins associated with Krebs cycle and mitochondrial oxidative phosphorylation was higher in HFD rats.

Conclusions Expression of proteins involved in left ventricle metabolic energy was enhanced before myocardial functionality was affected in rats fed with HFD. These findings may probably indicate higher cardiac energy requirement due to weight increase by HFD.

Keywords Fat diet · Energy metabolism · Heart · Proteomics

Introduction

Heart has high-ATP requirements that are produced using long-chain fatty acid β -oxidation as main metabolic pathway [1]. However, dietary guidelines recommend a high-carbohydrate/low-saturated-fat/low-cholesterol diet to prevent heart disease [2]. Depressed left ventricular function and ventricle hypertrophy have been associated with dietary lipid intake and elevated plasma insulin levels [3, 4]. In this regard, the expression of several proteins associated with the main energy metabolic pathways was reported changed in the rat left hypertrophied ventricle compared to that in non-hypertrophied ventricles [5].

In both animals and humans, weight gain and insulin resistance seem to alter cardiac metabolism [6]. In obesity, lipid accumulation within the myocardium was observed, and it was attributed to an imbalance between fatty acid uptake and oxidation [7]. However, many studies do not support that concept since in hearts with altered functionality related to obesity and insulin resistance, cardiac fatty

J. Modrego · J. J. Zamorano-León · P. J. Mateos-Cáceres ·
A. J. López-Farré (✉)
Cardiovascular Research Unit, Cardiovascular Institute, Hospital
Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del
Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Profesor Martín Lagos
s/n, Madrid, Spain
e-mail: ajlf@telefonica.net

N. de las Heras · B. Martín-Fernández · M. Valero-Muñoz ·
V. Lahera (✉)
School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain
e-mail: vlahera@med.ucm.es